

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**METATAXONOMIA BACTERIANA DO LEITE CAPRINO POR
SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON

**AREIA – PB
FEVEREIRO/2018**

CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON

**METATAXONOMIA BACTERIANA DO LEITE CAPRINO POR
SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira – Orientador principal

Profa. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez

Pesquisadora Dra. Poliana Fernanda Giachetto

AREIA – PB

FEVEREIRO/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

L579m Leon, Candice Maria Cardoso Gomes de.

METATAXONOMIA BACTERIANA DO LEITE CAPRINO POR
SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA / Candice Maria
Cardoso Gomes de Leon. - Areia, 2018.
95 f.

Orientação: Celso José Bruno Oliveira.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. caprinos, microbiologia, metagenômica. I.
Oliveira, Celso José Bruno. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: METATAXONOMIA BACTERIANA DO LEITE CAPRINO POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA


AUTOR: Candice Maria Cardoso Gomes de Leon


ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira


JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

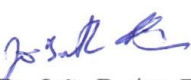
EXAMINADORES:


Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Profa. Dra. Juliana Silva de Oliveira
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Profa. Dra. Carla Aparecida Soares Saraiva
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Prof. Dr. João Batista Ribeiro
Examinador
EMBRAPA

Areia, 28 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CANDICE MARIA CARDOSO GOMES DE LEON – filha de João Gomes de Leon e M^a de Fátima Cardoso da Silva, nasceu em 27 de outubro do ano de 1989 na cidade de Campina Grande – PB. Graduiu-se no curso de Bacharel em Zootecnia pela Universidade Federal da Paraíba no ano de 2011, sendo bolsista de iniciação científica do CNPq de 2010 a 2011 no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal e apresentou trabalho de conclusão de curso intitulado “Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* associados à mastite caprina”, sob a orientação do professor Dr. Celso José Bruno de Oliveira. Em 2012 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração Produção animal, tendo como linha de pesquisa Avaliação de Produtos de origem animal, sob a orientação do professor Dr. Celso José Bruno de Oliveira e defendendo dissertação intitulada “Monitoramento e investigação ecoepidemiológica da contaminação por *Staphylococcus* spp. no beneficiamento do leite de cabra”. Em 2014 ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração Produção animal, tendo como linha de pesquisa Segurança alimentar. No ano de 2016, foi contemplada como representante brasileiro no projeto de intercâmbio de verão *Global Innovation Initiative* (GII) com realização de dois meses de atividades de investigação experimental na Universidade de Nottingham (Reino Unido), envolvidas no estudo intitulado “*Salmonella* resistência a múltiplas drogas (MDR): inativação de genes de resistência realizados em plasmídios e intervenção contra a transferência horizontal de plasmídios de resistência” sob a supervisão do Prof. Paul Barrow.

“A mesma água fervente que amolece a batata também torna o ovo duro. Não são as circunstâncias que mudam as pessoas, mas sim o que tem dentro delas.”

(Autor desconhecido)

*“Percebi que a única coisa necessária era unir-me mais a Jesus,
e o resto me seria dado de acréscimo.”*

(Santa Teresinha do Menino Jesus)

DEDICO

Ao meu esposo, **Francisco Ioneiton da Silva**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem você nenhuma conquista valeria à pena. Incalculável é a palavra que uso, pois não é possível quantificar as diversas vezes em que você me incentivou e acreditou em mim.

“...Quando os meus sonhos vi desmoronar me trouxeste outro pra recomeçar. Quando me esqueci que era laguem na vuda teu amor veio me lembrar: que Deus me ama, que não estou só, que Deus cuida de mim quando fala pela tua voz e me diz ‘CORAGEM!’ ”

(Múscia: Humano Amor de Deus - Autor: Pe. Fábio de Melo)

À professora e amiga **Patrícia Emília Naves Givisiez**, todo meu respeito e admiração pela sua serenidade e seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência. Quero seguir teu exemplo de pessoa e profissional.

*“Ser mestre é, antes de tudo, saber ensinar e aprender a cada dia.
É transmitir, além da sabedoria, confiança e entusiasmo.
É deixar lições de vida; das quais dificilmente nos esqueceremos.”*

(Giselle Rocha)

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese foi utilizar apenas uma página para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória de 10 anos no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

Primeiramente agradeço imensamente ao meu Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade concedida e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de 2014 a 2017.

Aos professores Celso José Bruno de Oliveira e Patrícia Emília Naves Givisiez pela orientação, credibilidade e amizade. Obrigada por todo o incentivo e pelas palavras de entusiasmo sempre me mostrando que eu poderia sempre ir mais além.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, bem como a todos os funcionários da Pós-graduação pelo respeito e carinho.

Aos Professores Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo, Dr. Mateus MatiuZZi da Costa, Dr. Rinaldo Aparecido Mota, Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto pela participação no Exame de Qualificação e pelas valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho.

A cada um dos produtores de leite que abriram não só as suas unidades produtivas, mas também seus lares e seus corações e assim deram ‘vida’ a este estudo.

Ao Victor Pylro pela realização das análises bioinformáticas e estatísticas.

À minha família por todo o incentivo, amor e atenção, acreditando sempre em mim.

Ao meu esposo Neiton por toda paciência e ajuda.

À equipe de trabalho do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA).

À turma de doutorado 2014 pelo companheirismo, apoio e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

Sem citar nomes, agradeço aos amigos de sempre pelo incentivo e amizade.

À todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais uma etapa em minha vida e por serem motivo de não desistir... Resisti!

OBRIGADA!

SUMÁRIO GERAL

	<i>Página</i>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xiv
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	15

CAPÍTULO I

Aplicações metagenômicas ao estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes

	<i>Página</i>
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. Diversidade das comunidades microbianas	21
2.2. Métodos utilizados para determinar a diversidade de comunidades microbianas.....	23
2.3. Metagenômica	27
2.3.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento <i>shotgun</i>	29
2.4. Microbiota do leite ruminantes.....	33
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

CAPÍTULO II

Caracterização da microbiota do leite caprino em diferentes períodos de lactação

	<i>Página</i>
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Amostragem e delineamento experimental	52
2.2. Análises laboratoriais	53
Lactocultura.....	53
Contagem bacteriana total (CBT) e Contagem de células somáticas (CCS).....	53
Composição química	54
Análise dos dados	54
2.3. Análises moleculares	54
Extração de DNA	54
Sequenciamento do gene 16S rRNA e bioinformática.....	55
Análise dos dados	55
3. RESULTADOS	56
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPÍTULO III
Diversidade bacteriana do leite de cabra em diferentes microrregiões do Estado da
Paraíba, Brasil

	<i>Página</i>
RESUMO.....	73
ABSTRACT	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1. Local de estudo e amostragem.....	76
2.2. Análises laboratoriais	77
Lactocultura.....	77
Contagem bacteriana total (CBT) e Contagem de células somáticas (CCS).....	77
Composição química	78
Análise dos dados	78
2.3. Análises moleculares	78
Extração de DNA	78
Sequenciamento do gene 16S rRNA e bioinformática.....	79
Análise dos dados	79
3. RESULTADOS	80
4. DISCUSSÃO	84
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
APÊNDICES	94
APÊNDICE A.....	94
APÊNDICE B.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
16S	Subunidade ribossomal dos procariotos
ANOVA	Análise de variância
APHA	Associação Americana de Saúde Pública (EUA)
BAL	Bactérias ácido-láticas
BMP	Projeto Microbioma brasileiro
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	e Contagem de células somáticas
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
FDA	Departamento Federal de Agricultura
Log10	Logaritmo na base 10
mg	miligrama
mL	mililitro
NGS	Sequenciamento de “próxima geração” ou “nova geração”
NMC	Conselho Nacional de Mastite (EUA)
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
pb	Pares de base
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PERMANOVA	Análise de variância multivariada permutativa
PGM	Personal Genome Machine
<i>primer</i>	Iniciador molecular
RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição
RISA	Análise do espaçador interno de rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR	PCR Quantitativa em Tempo Real
SSCP	Polimorfismo de conformação de uma única linha
TSA	Ágar triptona de soja
UFC/mL	Unidades formadora de colônia por mililitro

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Aplicações metagenômicas ao estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes

Página

Tabela 1. Histórico da evolução da microbiologia em paralelo ao sequenciamento de DNA.	25
Tabela 2. Gêneros bacterianos detectados em leite caprino utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo	35

CAPÍTULO II

Caracterização da microbiota do leite caprino em diferentes períodos de lactação

Página

Tabela 1. Valores médios da composição químico do leite e da Contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação.....	57
---	----

CAPÍTULO III

Diversidade bacteriana do leite de cabra em diferentes microrregiões do Estado da Paraíba, Brasil

Página

Tabela 1. Valores médios dos componentes químicos do leite em percentual (%) e Contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano.....	81
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Aplicações metagenômicas ao estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes

Página

- Figura 1.** Fluxograma de etapas do sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA e *shotgun*. Adaptado por: Morgan e Huttenhower (2012)28
- Figura 2.** Gene 16S rRNA desenhado com base na sequência de *E. coli* (Brosius et al., 1981; Chakravorty et al., 2007). Marcações em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no domínio Bacteria29
- Figura 3.** Crescimento do GenBank entre anos de 1990-2017 em número de sequências depositadas e em pares de base de DNA. (Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>)33

CAPÍTULO II

Caracterização da microbiota do leite caprino em diferentes períodos de lactação

Página

- Figura 1.** Dinâmica dos filos mais abundantes da comunidade bacteriana em amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA57
- Figura 2.** Composição bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA 58
- Figura 3.** Diversidade alfa de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação. Boxplots baseados nos índices: A = Chao1 ($p=0,60$) e C = Shannon ($p=0,45$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente59
- Figura 4.** Diversidade beta de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação. PCoA e NMDS baseados nos índices: A = Unifrac não-ponderada ($p<0,473$) e B = Bray-Curtis ($p<0,41$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente60
- Figura 5.** Análise da expressão diferencial da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente61

CAPÍTULO III

Diversidade bacteriana do leite de cabra em diferentes microrregiões do Estado da Paraíba, Brasil

Página

Figura 1. Composição bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.....	81
Figura 2. Diversidade alfa de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano. Boxplots baseados nos índices: A = Chao1 ($p=0,03$) e C = Shannon ($p=0,39$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo.....	82
Figura 3. Diversidade beta de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano. PCoA e NMDS baseados no índice Unifrac não ponderada ($p<0,001$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo.....	83
Figura 4. Análise da expressão diferencial da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo	84

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LEITE CAPRINO POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

RESUMO GERAL – Objetivou-se por meio deste estudo a caracterização da microbiota do leite caprino através do sequenciamento do gene 16S rRNA associada a diferentes períodos de lactação e quando as cabras são criadas em diferentes regiões geográficas. No primeiro capítulo, apresentamos um referencial teórico que abrange um breve histórico sobre o estudo das comunidades microbianas e os métodos utilizados para tal e finalizando com uma apresentação de estudos metagenômicos com leite caprino e de outras espécies baseados no sequenciamento de DNA. No segundo capítulo, objetivou-se determinar a comunidade microbiana do leite caprino ao longo da lactação em animais livres de infecção intramamária. Foram coletadas amostras de leite de cabras mestiças e multíparas em uma propriedade localizada no semiárido paraibano em três períodos de lactação: inicial (50 dias), intermediário (100 dias) e final (150 dias). *Nocardioide*s foi o gênero bacteriano mais abundante independente do período de lactação. *Pseudomonas* e *Acinetobacter* foram estatisticamente mais abundantes no período de lactação intermediário (FDR <0.05 na análise de expressão diferencial) e isto, possivelmente esteja associado ao teor de proteína significativamente superior neste mesmo período lactacional. Os gêneros *Staphylococcus* e *Sphingomonas* foram mais abundantes no final da lactação, sugestivamente, dado ao aumento do teor de gordura e CCS neste mesmo período de lactação. No terceiro capítulo, objetivou-se caracterizar comparativamente a microbiota do leite de cabras sem infecção intramamária criadas em duas microrregiões do estado da Paraíba. Foram coletadas amostras de leite caprino (cabras mestiças e multíparas) em uma propriedade localizada na microrregião Cariri e em uma propriedade localizada na microrregião Brejo da Paraíba aproximadamente aos 80 dias de lactação. A riqueza da comunidade bacteriana do leite caprino foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre as regiões estudadas. Contudo, os gêneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Anoxybacillus* e *Escherichia-Shigella* apresentaram abundância diferencial para as regiões avaliadas (FDR <0.05 na análise de expressão diferencial). Os dados gerados demonstram que a microbiota do leite caprino é complexa e que fatores fisiológicos (lactação) e geográficos (clima e alimentação) influenciam na composição e estrutura desta comunidade bacteriana.

Palavras-chave: caprinos, microbiologia, metagenômica

CHARACTERIZATION OF GOAT MILK MICROBIOTA BY 16S rRNA GENE SEQUENCING

GENERAL ABSTRACT - The objective of this study was to characterize the goat milk microbiota by sequencing the 16S rRNA gene associated with different lactation periods and when goats are reared in different geographic regions. In the first chapter, we present a theoretical reference that covers a brief history about the study of microbial communities and the methods used for this and ending with a presentation of metagenomic studies with goat milk and other species based on DNA sequencing. In the second chapter, the objective was to determine the microbial community of goat milk throughout lactation in animals free of intramammary infection. Milk samples were collected from crossbred and multiparous goats on a farm located in the semiarid region of Paraíba in three lactation periods: initial (50 days), intermediate (100 days) and final (150 days). *Nocardioides* was the most abundant bacterial genus independent of the lactation period. *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were statistically more abundant in the intermediate lactation period (FDR <0.05 in the differential expression analysis) and this is possibly associated with significantly higher protein content in the same lactation period. The genus *Staphylococcus* and *Sphingomonas* were more abundant at the end of lactation, suggestively, given the increase in fat content and CCS in this same period of lactation. In the third chapter, the objective was to characterize comparatively the microbiota of the milk of goats without intramammary infection created in two microregions of the state of Paraíba. Samples of goat milk (crossbred and multiparous goats) were collected from a property located in the Cariri micro region and at a property located in the Brejo da Paraíba micro region approximately 80 days after lactation. The richness of the bacterial community of goat milk was significantly different ($p < 0.05$) among the studied regions. However, the genera *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Anoxybacillus* and *Escherichia-Shigella* presented differential abundance for the regions evaluated (FDR <0.05 in the differential expression analysis). The data generated demonstrate that the goat milk microbiota is complex and that physiological (lactation) and geographic factors (climate and food) influence the composition and structure of this bacterial community.

Keywords: goats, microbiology, metagenomics

CONSIDERAÇÕES INICIAS

A caprinocultura leiteira no Brasil é uma atividade secular, porém em expansão econômica, destacando-se como alternativa para a agricultura familiar, em especial nas regiões semiáridas. O leite considerado de boa qualidade está ligado a um aporte nutricional, sobretudo quanto à ausência de agentes patogênicos e contaminantes, baixa carga microbiana e reduzida contagem de células somáticas. Assim, a identificação da comunidade microbiana presente no leite é importante para garantir a segurança do leite cru e dos produtos lácteos.

No entanto, a comunidade microbiana do leite é tradicionalmente estudada por técnicas de cultivo microbiológico convencionais focando grupos de bactérias específicos. Com o advento dos métodos moleculares como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foi possível uma rápida identificação de indivíduos da comunidade microbiana presente em vários ambientes, entre eles, o leite. No entanto, a partir desta técnica é fornecida, geralmente, a detecção de um único organismo ou um número muito limitado de organismos. Se o objetivo da identificação bacteriana for incerto ou desconhecido, um grande número de ensaios e testes são necessários para determinar o microrganismo causador, o que pode exigir e consumir muito tempo e muitos insumos laboratoriais. Neste sentido, uma técnica independente de cultivo que detecte a presença de quaisquer alvos microbianos simplificaria consideravelmente a análise em questão.

No entanto, recentes progressos nas técnicas de microbiologia independentes de cultivo (metagenômica) aliados ao advento do sequenciamento de DNA de nova geração (sequenciamento de DNA em larga escala) têm permitido conhecimento mais profundo sobre a comunidade bacteriana de diferentes ambientes e seres vivos. A partir de então, diversos microrganismos anteriormente não relatados estão sendo revelados, mas, poucos dados foram reportados com leite caprino, sendo o leite humano e bovino os objetos de estudos encontrados na literatura que utilizam a tecnologia em questão.

A tese apresentada está estruturada em três capítulos, onde o Capítulo I apresenta um referencial teórico abordando um breve histórico sobre a evolução da metodologia usada para o estudo das comunidades microbianas e, por fim, uma descrição sucinta de estudos metagenômicos com o leite de ruminantes. Nos Capítulos II e III, abordagem metagenômica baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA foi aplicada para caracterizar a diversidade da microbiota do leite caprino livre de infecção intramamária em diferentes períodos de lactação, e quando produzido em diferentes regiões geográficas, respectivamente.

CAPÍTULO I

Referencial teórico:

Aplicações metagenômicas ao estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes

APLICAÇÕES METAGENÔMICAS AO ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO LEITE DE RUMINANTES

RESUMO: As técnicas tradicionais de cultivo de microrganismos em laboratório apresentam limitações, e assim, estima-se que, de toda a diversidade de microrganismos encontrados no leite, apenas 0,1 a 1% sejam cultiváveis. Neste sentido, apesar do conhecimento sobre a diversidade microbiana do leite já existente, deixa-se de contabilizar um grande potencial biotecnológico que pode estar contido nesses seres incultiváveis, que podem ser responsáveis pela síntese de moléculas de interesse biotecnológico ainda desconhecido. A metagenômica juntamente com o desenvolvimento paralelo de tecnologias de sequenciamento de nova geração, surge como uma alternativa e tem permitido inúmeras abordagens para a caracterização detalhada da microbiota do leite, permitindo identificar e quantificar com resolução de tempo e espaço, independentemente do cultivo prévio de microrganismos. E assim, estudos direcionados a compreensão detalhada da microbiota do leite são necessários e representam uma estratégia para incremento nas produções leiteiras que revertem em benefícios para este setor emergente de laticínios não só para a indústria, como também para o consumidor. O leite materno em humanos impulsionou as primeiras hipóteses e experimentos, e recentemente, seguindo estes estudos sobre ecologia do leite, abordagens metagenômicas começaram a ser aplicadas também sobre o leite de ruminantes. Porém, é o leite bovino o alvo da maioria dos trabalhos encontrados na literatura, havendo escassez de estudos com leite de outras espécies. Foram abordadas nesta revisão as últimas aplicações metagenômicas no estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes, apartir de uma breve introdução sobre o estudo das comunidades microbianas e os métodos utilizados para sua detecção, e em seguida foi dissertado uma visão geral das várias populações microbianas encontradas no leite de ruminantes, sua interação com o hospedeiro e a influência de fatores que podem moldar esta microbiota.

Palavras-chave: ruminantes, microbiota, técnicas independentes de cultivo, sequenciamento de nova geração

METAGENOMIC APPLICATIONS TO THE STUDY OF MICROBIAL DIVERSITY OF RUMINANTS MILK

ABSTRACT: The traditional techniques of microorganism cultivation in the laboratory have limitations, and thus it is estimated that of all the diversity of microorganisms found in the milk, only 0.1 to 1% are cultivable. In this sense, in spite of the knowledge about the microbial diversity of the already existing milk, a great biotechnological potential that can be contained in these incultivable beings, that can be responsible for the synthesis of molecules of biotechnological interest still unknown, is not counted. The metagenomics coupled with the parallel development of new generation sequencing technologies, has emerged as an alternative and has allowed numerous approaches to the detailed characterization of the milk microbiota, allowing identification and quantification with resolution of time and space, regardless of the previous culture of microorganisms. Thus, studies aimed at the detailed understanding of the milk microbiota are necessary and represent a strategy to increase dairy production that rewards benefits for this emerging dairy sector, not only for the industry, but also for the consumer. Breast milk in humans stimulated the first hypotheses and experiments, and recently, following these studies on milk ecology, metagenomic approaches began to be applied also on ruminant milk. However, bovine milk is the target of most of the studies found in the literature, and there is a shortage of studies with milk from other species. The last metagenomic applications in the study of the microbial diversity of ruminant milk were discussed in this review, with a brief introduction on the study of the microbial communities and the methods used for their detection, and then an overview of the various microbial populations found in ruminant milk, its interaction with the host and the influence of factors that can shape this microbiota.

Key words: ruminants, microbiota, independent cultivation techniques, new generation sequencing

1. INTRODUÇÃO

O leite constitui-se de um alimento que além de satisfazer as necessidades nutricionais e possui papel funcional ao longo do desenvolvimento da prole, devido às suas características de composição e disponibilidade de nutrientes. Ademais, o leite proporciona um ambiente ideal para o crescimento de diversos microrganismos que impacta diretamente na qualidade e vida útil do leite como matéria-prima, no desenvolvimento subsequente de produtos lácteos e na sanidade do animal hospedeiro e/ou do consumidor (Oliver et al., 2009; Quigley et al., 2013).

As técnicas tradicionais de cultivo de microrganismos em laboratório apresentam limitações uma vez que não fornecem as mesmas condições e interações encontradas no ambiente. Assim, estima-se que, de toda a diversidade de microrganismos encontrada no leite, apenas 0,1 a 1% sejam cultiváveis (Amann et al., 1995, Rappé e Giovannoni, 2003). Com isso, além do baixo conhecimento sobre a diversidade microbiana do leite, deixa-se de contabilizar um grande potencial biotecnológico que pode estar contido nesses seres incultiváveis, que podem ser responsáveis pela síntese de moléculas de interesse biológico ainda desconhecido.

Por muito tempo, acreditava-se que a glândula mamária e o leite nela contido eram estéreis e que a maior parte da comunidade microbiana encontrada no leite era resultado de uma contaminação externa (FAO, 1990; Young et al., 2015). No entanto, devido a progressos recentes e significativos em técnicas independentes de cultivo, a microbiota do leite é hoje entendida como um complexo ecossistema que apresenta grande diversidade e papéis biológicos multifacetados, interagindo com nutrientes e com as células do hospedeiro (Hood, 2012; Addis et al., 2016). Assim, o interesse pela compreensão da microbiota do leite tem crescido significativamente nas últimas décadas.

O atual momento pós-genômica tem revelado as denominadas “Ciências Meta-Ômicas”, que possibilitam a análise global dos sistemas biológicos. Particularmente, a metagenômica, surge como uma alternativa e tem permitido inúmeras abordagens para a caracterização detalhada da microbiota do leite, permitindo identificar e quantificar microrganismos com resolução de tempo e espaço, independentemente do cultivo prévio (Souza, Rhoden e Pamphilea, 2014). A microbiota do leite humano tem sido objeto de diversos estudos nos últimos anos (Ward et al., 2013; Jost et al., 2014; Jiménez et al., 2015; Urbaniak et al., 2016; Patel et al., 2016), visando elucidar seu papel na fisiologia e na saúde da mãe e do bebê. Por outro lado, o foco da maioria dos estudos sobre a microbiota de ruminantes leiteiros tem sido abordada na forma como a composição microbiana do leite

muda quando se torna produto alimentar, seja para consumo direto ou para transformação em produtos lácteos ou ainda voltados para a etiologia da mastite (Silva et al., 2012; Neviani et al., 2013; Delcenserie et al., 2014; Dalmaso et al., 2016; Kable et al., 2016), ou seja, considerando a ecologia microbiana do leite cru e não como a microbiota do leite se comporta no contexto da fisiologia e saúde do animal.

Apesar do avanço em estudos sobre a microbiota do leite de ruminantes, é o leite bovino o alvo da maioria dos trabalhos encontrados na literatura (Kuehn et al., 2013; Oikonomou et al., 2012; Oikonomou et al., 2014; Zhang et al., 2015; Falentin et al., 2016), sendo escasso estudos acerca de outras espécies, como caprinos, ovinos, entre outros. De maneira particular, é observado que a importância dos caprinos para a indústria láctea tem aumentado significativamente nos últimos anos, especialmente nos países em desenvolvimento, uma vez que tem elevado impacto econômico e social e é uma ferramenta essencial para superar questões sociais e econômicas, como a pobreza e a desnutrição. Nos países desenvolvidos, o leite caprino é considerado uma alternativa mais saudável ao leite de vaca; apresenta ainda propriedades organolépticas significativas, quer para consumo direto ou na forma de queijos e outros derivados (McDermott et al., 2010).

No Brasil, por sua vez, a caprinocultura leiteira é ainda considerada uma atividade rentável recente, o que pode justificar sua baixa produção, principalmente se comparado a alguns países da Ásia, África e Europa, onde é desenvolvida como uma das principais fontes de renda de produtores rurais e indústrias, possuindo mercado consumidor bem definido e estável. Ainda assim, o Brasil é um dos maiores produtores de leite de cabra da América Latina, apresentando produção maior que 250 mil toneladas no ano de 2017 (FAOSTAT, 2018), apontando para um futuro promissor para o setor.

Portanto, é fundamental compreender as modificações associadas à lactação desses animais, a fim desenvolver estratégias para melhorar a produção de leite ou reduzir o efeito de infecções da glândula mamária que diminuem a produção de leite, bem como depreciam a qualidade do leite produzido. Uma gestão adequada à produção leiteira não pode ser alcançada sem o conhecimento dos aspectos biológicos subjacentes à lactação desses animais (Lérias et al., 2014), assim, estudos direcionados a compreensão detalhada da microbiota do leite caprino são necessários e representam uma estratégia para incremento nas produções leiteiras que revertem em benefícios para este setor emergente de laticínios não só para a indústria, como também para o consumidor.

Nesta revisão, apresentamos, resumidamente, as mais recentes aplicações metagenômicas no estudo da diversidade microbiana do leite de ruminantes, de maneira

especial, o leite caprino. Para tanto, ao iniciar sobre o estudo das comunidades microbianas e os métodos utilizados para sua detecção, apresentamos uma visão geral das várias populações microbianas encontradas no leite caprino, e nos demais animais ruminantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diversidade das comunidades microbianas

O termo “microrganismo” é uma definição operacional, que congrega táxons variados de organismos unicelulares microscópicos, que vivem na natureza como células isoladas ou em agregados celulares. Esta definição abarca os grupos das bactérias, arqueas, fungos, protozoários, alocados dentro dos três grandes domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya. A diversidade microbiana, considerando-se os parâmetros de diversidade de espécies e diversidade genética, pode suplantar, em algumas ordens de magnitude, a diversidade existente em todos os demais grupos de seres vivos.

Os microrganismos foram os primeiros seres vivos a colonizar a Terra. Estima-se que os primeiros microrganismos surgiram há mais de 3,5 bilhões de anos, em um período geológico em que a Terra passava por grandes transformações geológicas e químicas, e quando a atmosfera ainda não tinha oxigênio. A ação de processos metabólicos microbianos ao longo do tempo resultou na formação de uma atmosfera rica em oxigênio, permitindo o surgimento e evolução de novas formas de vida aeróbias, organismos multicelulares complexos, plantas e animais superiores (Atlas e Bartha, 1998).

Hoje, os microrganismos são encontrados em todo nicho ecológico sobre a Terra, inclusive em locais cujas condições ambientais extrapolam os limites de tolerância de animais e plantas. Devido a sua relativa simplicidade morfológica e grande diversidade genética e metabólica, os microrganismos se adaptaram para viver em habitats e condições diversas no planeta (Kato et al., 1997; Orphan et al., 2000). Logo, a existência e a diversidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à atividade metabólica de microrganismos na natureza (Trüper, 1992).

O papel dos microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido diante de sua magnitude. Sabe-se, contudo, que os microrganismos têm papel central na evolução geológica, geoquímica e biológica; catalisam transformações únicas e indispensáveis nos ciclos biogeoquímicos da biosfera (são capazes de reciclar carbono, fósforo e nitrogênio da matéria orgânica morta), decompõem poluentes, são atuantes em causar e/ou evitar doenças em plantas, animais e humanos – pensados como sendo estas ações

conduzidas por processos inorgânicos e estresse, respectivamente – e assim, por milhões de anos vem sofrendo mutações, levando a uma enorme diversidade genética e variação fenotípica (Sogin et al., 2006; Xu, 2006).

As comunidades microbianas são definidas como conjuntos de várias espécies que interagem em um ambiente compartilhado. Tais comunidades são formadas de populações de microrganismos que conduzem processos fisiológicos interdependentes (Davey e O'Toole, 2000) e evoluíram para formar uma parte essencial da composição genética do hospedeiro, que é vital para a manutenção da sua saúde (Costello et al., 2009).

O termo “microbioma” refere-se a todo o habitat, incluindo microrganismos, os seus genomas e as condições ambientais circundantes. Esta definição é baseada na definição de “bioma”, com fatores bióticos e abióticos de um dado ambiente. Os microbiomas normalmente consistem de nichos ambientais ou biológicos contendo comunidades complexas de microrganismos. O termo “microbiota” refere-se aos organismos microbianos que constituem o microbioma. A microbiota pode variar de acordo com o hospedeiro e o ambiente (Cho e Blaser, 2012).

Assim, os microrganismos que habitam os diversos sítios anatômicos do corpo humano e animal são classificados em dois grupos: microbiota residente e microbiota transitória (Ursell et al., 2012). Naturalmente, os indivíduos saudáveis apresentam uma microbiota residente que os coloniza (composta majoritariamente por bactérias), e esta microbiota estabelece relações de mutualismo, comensalismo e parasitismo, podendo causar doenças em imunocomprometidos.

A microbiota residente, também chamada de autóctone ou indígena é formada por diversos tipos de microrganismos relativamente fixos, encontrados com regularidade em certos locais e em determinada idade, mas quando destruída, se recupera rapidamente. Possui papel importante na manutenção da integridade do hospedeiro, quando em equilíbrio em um sítio específico. Ela oferece barreiras contra colonização por patógenos pois competem com as bactérias transientes por sítio de adesão e por nutrientes. Além de muitas produzirem ácidos e bactericidas e outras moléculas ativas, produzem substâncias utilizáveis pelo hospedeiro, degradam produtos tóxicos e participam da modulação do sistema imune do hospedeiro. Já a microbiota transitória ou alóctone pode ser caracterizada como microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, encontrados em superfícies externas e internas, durante algumas horas, dias ou mesmo semanas, em sítios específicos. Possui pouca importância se a microbiota residente estiver em equilíbrio. Caso ocorra

alteração neste equilíbrio, os microrganismos transitórios podem proliferar-se e produzir doença (Ursell et al., 2012; Lloyd-Price, Abu-Ali e Huttenhower, 2016).

Em contrapartida, a microbiota residente pode acarretar em malefícios para a saúde do hospedeiro quando células individuais de sítios específicos atingem a corrente sanguínea (por lesão do epitélio intestinal, por exemplo); quando outros membros da microbiota são suprimidos, e assim um membro que vivia em pequeno número aumenta causando doenças, ou seja, em condições de desequilíbrio. Portanto, nem sempre essa convivência é pacífica, pois existem microrganismos denominados oportunistas, que convivem no organismo e apenas esperam uma diminuição da resistência orgânica para ocasionar algumas doenças (Blaser e Falkow, 2009).

Uma vez que a diversidade de microrganismos encontrada nos mais diferentes ambientes é extremamente grande, na mesma escala apresenta-se em complexidade. Diversas estratégias têm sido usadas para estudar as relações entre funcionamento de ecossistemas e estrutura de comunidades microbianas. Contudo, apesar da evolução na microbiologia, a capacidade das comunidades microbianas e sua versatilidade metabólica permanecem ainda com diversos pontos obscuros e assim, o entendimento da estrutura, funções, estabilidade e adaptações das populações microbianas é extremamente importante para pesquisas básicas, biotecnologia, agricultura, ambiente e na saúde humana e animal (He et al., 2007).

2.2. Métodos utilizados para determinar a diversidade de comunidades microbianas

As raízes da microbiologia e o estudo das comunidades microbianas estão firmemente associados ao microscópio (Handelsman, 2004). Historicamente, a demonstração de que os microrganismos podiam causar doenças forneceu um grande impulso ao desenvolvimento da microbiologia. Durante mais de 200 anos a microbiologia passou por diversos avanços, dentre esses estava o trabalho do botânico Ferdinand Cohn, que classificou muitas bactérias e descreveu o ciclo de vida de *Bacillus subtilis* com base em suas observações microscópicas. A partir do trabalho do médico Robert Koch, em 1876, ficou demonstrado a possibilidade de se cultivar microrganismos em líquidos nutritivos e fora do hospedeiro, resultando no desenvolvimento dos meios de cultura. Somente então, o mundo microbiano foi considerado conquistado e revelado. Mais tarde, o Manual de Bergey, em 1923, declarou categoricamente que nenhum organismo poderia ser classificado sem ser cultivado, e como resultado, a maior parte do conhecimento que preenche os modernos livros de microbiologia é derivada de organismos mantidos em cultura laboratorial.

Em contrapartida, nos últimos 40 anos, a microbiologia experimentou uma transformação que alterou a visão dos microbiologistas sobre os microrganismos e como estudá-los: a percepção de que há limitações nos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório (Pace, 1997; Rappé e Giovannoni, 2003). A utilização de meios e condições de cultivo incompatíveis com as condições encontradas no ambiente natural dos microrganismos deixou claro que essas limitações têm contribuído para a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais (Rappé e Giovannoni, 2003).

Sem dúvidas, a complexidade das comunidades microbianas representa um desafio para a biotecnologia. Estimativas indicam que apenas uma pequena fração dos microrganismos na natureza, entre <0,1 a 1%, dependendo do habitat, são cultivados por intermédio do emprego de métodos microbiológicos convencionais, o que tem limitado o conhecimento quanto à ecologia microbiana e suas potencialidades para aplicação biotecnológica. É provável, ainda, que a fração não cultivada inclua diversos microrganismos distantemente relacionados aos microrganismos cultiváveis (Amann et al., 1995; Rappé e Giovannoni, 2003). De fato, a maioria das espécies microbianas em muitos ambientes ainda não foi descrita, porém diversos avanços biotecnológicos têm permitido mudanças de paradigmas no estudo da diversidade microbiana (Entcheva et al., 2001).

Segundo Hall (2007), o sequenciamento de genomas impulsionou uma revolução nas ciências biológicas e, atualmente, as técnicas de sequenciamento são amplamente aplicadas ao estudo da diversidade microbiana (Tabela 1). Durante aproximadamente 30 anos após a sua publicação em 1977, o método de Sanger de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977) foi o padrão utilizado. Em 1983, Kary Mullis desenvolveu a técnica de amplificação de DNA, a chamada Reação em cadeia da Polimerase (PCR), que garantia com acurácia os estudos moleculares. Porém, em 1985 aconteceu uma grande evolução no estudo da diversidade microbiana, em que Carl Woese demonstrou que os genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência evolutiva. Essa metodologia ficou conhecida como filotipagem que consta da análise direta da sequências desses genes foi utilizada para a descrição da diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, sem isolamento ou cultivo (Lane et al., 1985).

Diferentes técnicas de sequenciamento empregando o gene ribossomal bacteriano como marcador de diversidade filogenética foram desenvolvidas, advindo a eletroforese em agarose ou poliacrilamida e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). A criação do primeiro sequenciador automático (ABI 370) em 1986 foi fundamental para

acelerar os estudos genômicos de diversidade microbiana, a partir daí, surgiram técnicas como RISA (*rRNA Internal Spacer Analysis* - análise do espaçador interno de rRNA), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição).

Tabela 1. Histórico da evolução da microbiologia em paralelo ao sequenciamento de DNA.

Ano	Acontecimento
1632	Descoberta e uso do microscópico
1876	Robert Koch provou a possibilidade de se cultivar microrganismos em líquidos nutritivos e fora do hospedeiro, resultado no surgimento dos denominados meios de cultura;
1923	Manual de Bergey declarou categoricamente que nenhum organismo poderia ser classificado sem ser cultivado;
1977	Frederick Sanger desenvolveu o primeiro método de sequenciamento de DNA de terminação de cadeia por didexinucleotídeos, denominado método Sanger;
1983	Kary Mullis desenvolveu a técnica de amplificação de DNA, denominado PCR (Reação em cadeia da polimerase);
1985	Carl Woese demonstrou que os genes do RNA ribossomal poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência e surgiu assim, a análise denominada filotipagem;
1986	Lançamento do 1º sequenciador automático de DNA, o ABI 370;
1987	Inclusão de um passo de clonagem de longas regiões de DNA do genoma de um hospedeiro cultivável;
1995	Sequenciamento do 1º genoma de um microrganismo de vida livre, o <i>Haemophilus influenzae</i> ;
1997	Número elevado de questionamento acerca das limitações encontradas nos métodos microbiológicos convencionais;
1998	Lançamento do 1º sequenciador de DNA de eletroforese capilar, o ABI 3700;
2004	Lançamento do sequenciador de DNA 454 da empresa Roche, utilizando o método pirosequenciamento;
2005	Novos métodos de sequenciamento de DNA em larga escala, denominados sequenciamento de “próxima geração” ou “nova geração”;
2005	Lançamento de outros equipamentos de sequenciamento de DNA, como: <i>Genome Analyzer</i> da Solexa e <i>Solid</i> da Agencourt;
2010	Lançamento da plataforma Illumina GA/HiSeq;
2011	Lançamento dos sequenciadores <i>benchtop</i> ou sequenciadores de bancada;

Em 1987, a inclusão de um passo de clonagem de longas regiões de DNA do genoma em um hospedeiro cultivável possibilitou o surgimento de uma nova linha de pesquisa em diversidade microbiana e na biotecnologia de microrganismos e assim, após oito anos, em 1995, o primeiro genoma de um microrganismo de vida livre, o *Haemophilus influenzae*, foi sequenciado por completo. Após o advento dos sequenciadores automáticos, em 1998 (primeiro sequenciador de eletroforese capilar foi lançado, o ABI 3700), estas máquinas de sequenciar foram sendo aprimoradas. Paralelamente, havia esforços para o desenvolvimento de técnicas que melhorassem tanto o rendimento como o custo dos sequenciadores existentes. Em 2005, portanto, surgem novos métodos de sequenciamento: as tecnologias chamadas de

“próxima geração” ou “nova geração”, ou simplesmente, NGS (do inglês *Next-Generation Sequencing*) (Metzker, 2010; Klassen e Currie, 2012).

Os sequenciadores de nova geração utilizam metodologias diferentes da de Sanger, com o objetivo de acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento. Apesar de serem diferentes entre si, todos os sequenciadores de nova geração (NGS) se baseiam no processamento massivo de fragmentos de DNA. Basicamente, todas essas novas metodologias utilizam diferentes estratégias para eliminar as etapas mais laboriosas do método de Sanger, que são a clonagem em vetores bacterianos e a eletroforese. Enquanto um sequenciador de eletroforese capilar processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração podem sequenciar mais de 500 milhões de fragmentos ao mesmo tempo (Chevreux, 2004).

A primeira plataforma de nova geração a ser comercializada foi a 454, da empresa Roche. Essa plataforma realiza o sequenciamento baseado em síntese, através de uma técnica conhecida como pirosequenciamento (Margulies et al., 2005). Depois desta, vieram o *Genome Analyzer* da Solexa (adquirida pela Illumina mais tarde) e *Solid* da Agencourt (adquirida pela *Applied Biosystems* mais tarde). Após o desenvolvimento destas três plataformas surgiram outras, voltadas para necessidades mais específicas, como a plataforma Illumina GA/HiSeq, criada em 2010, com capacidade maior, gerando 600 Gb por corrida (em 8 dias). Entre as plataformas citadas, as da Illumina se destacam pelo grande volume de sequências obtidas, grande espectro de utilidade, além de ter o menor custo por base sequenciada (Glenn, 2011) do mercado, o que faz com que a empresa venha dominando a indústria de sequenciamento em larga escala (Quail et al., 2012).

Mais recentemente, a introdução de sequenciadores de bancada (chamados de sequenciadores *benchtop*) trouxe para pequenos laboratórios a capacidade de sequenciamento, que anteriormente era exclusiva para grandes centros de sequenciamento de DNA. Cinco máquinas *benchtop* estão atualmente disponíveis: 454 GS Junior, Ion Torrent da Personal Genome Machine (PGM), Illumina MiSeq, HiSeq e NextSeq 500 (Liu et al, 2012; Sanschagrin e Yergeau, 2014).

No centro dessa revolução está a evidência convincente de que o mundo microbiano invisível pode e necessita ser estudado, e por consequência, a análise genômica de uma população de microrganismos surgiu como peça-chave de um novo avanço na pesquisa da diversidade microbiana. Assim, capturado para estudo e preservação, o genoma de toda a comunidade microbiana de um ambiente poderia ser utilizado na busca de informações sobre a fisiologia e a genética de organismos não cultiváveis (Handelsman, 2004), surgindo assim a

metagenômica (Handelsman, 1998), ferramenta extremamente poderosa para estudos de diversidade microbiana (Bailly et al., 2007).

2.3. Metagenômica

Entre os métodos em estudos de diversidade microbiana, a metagenômica tem emergido como uma estratégia eficaz, correspondendo à análise genômica de comunidades microbianas complexas encontradas em habitats naturais. O termo metagenômica se refere à abordagem independente de cultivo baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é baseado na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (Handelsman et al., 1998).

O termo metagenômica foi descrito pela primeira vez por Jo Handelsman da Universidade de Wisconsin (EUA), em 1998, a partir da sugestão de uma série de procedimentos para acessar o metabolismo de microrganismos desconhecidos do solo (Handelsman et al., 1998). Em grego, a palavra *meta* significa “transcendente”. Isso significa que essa abordagem vai além das análises genômicas que, de maneira geral, são aplicadas em microrganismos cultivados. Comunidade genômica, genômica ambiental, e genômica populacional são sinônimos para a mesma abordagem (Handelsman, 2004; Aguiar-Pulido et al., 2016).

O estudo da diversidade de comunidades microbianas sofreu uma revolução com o estabelecimento da metagenômica. Com a aplicação dessa abordagem os pesquisadores passaram a ter acesso ao genoma de uma maior variedade de microrganismos que não haviam sido isolados em meio de cultura em laboratório. Sendo assim, a abordagem metagenômica se caracteriza por contornar a necessidade de cultivo e por ser conduzida em grande escala, em função da vasta diversidade microbiana (Schloss e Handelsman, 2005). Assim, têm sido caracterizadas comunidades microbianas de diversos habitats e/ou sítios anatômicos de humanos e animais, que vão desde regiões mais óbvias como pele e trato geniturinário, para as menos óbvias, como as vias aéreas e incluindo áreas que antes eram consideradas absolutamente desprovidas de microrganismos como a placenta (Cao et al., 2014; Mor e Kwon, 2015) e o feto (Silasi et al.; 2015).

Atualmente, a metagenômica usada para caracterização de todo o conjunto de genomas microbianos é dividida em duas áreas de pesquisa impulsionadas por aplicações tecnológicas: pesquisas ambientais com gene direcionado, baseado no sequenciamento alvo do gene 16S rRNA, e estudos aleatórios de todos os genes ambientais baseado no

sequenciamento metagenômico *shotgun*. A primeira técnica, por ser baseada no sequenciamento alvo do gene 16S rRNA, pode ser vista como um estudo metagenômico direcionado e focalizado (Sanschagrín e Yergeau, 2014).

Suncintamente, para o estudo de diversidade utilizando o gene ribossomal 16S, amplifica-se por PCR a sequência 16S e se compara o resultado com um banco de dados de bactérias conhecidas. Com isso, é possível avaliar e comparar a diversidade de bactérias presentes na amostra a partir de classificação taxonômica até o nível do gênero. No sequenciamento *shotgun* não se faz nenhuma seleção de alvo previamente: todo o DNA extraído da amostra é fragmentado e sequenciado. A análise consiste em montar o “metagenoma” da amostra para tentar identificar, além da microbiota existente (bactérias, fungos e vírus), a predição de genes funcionais (Figura 1).

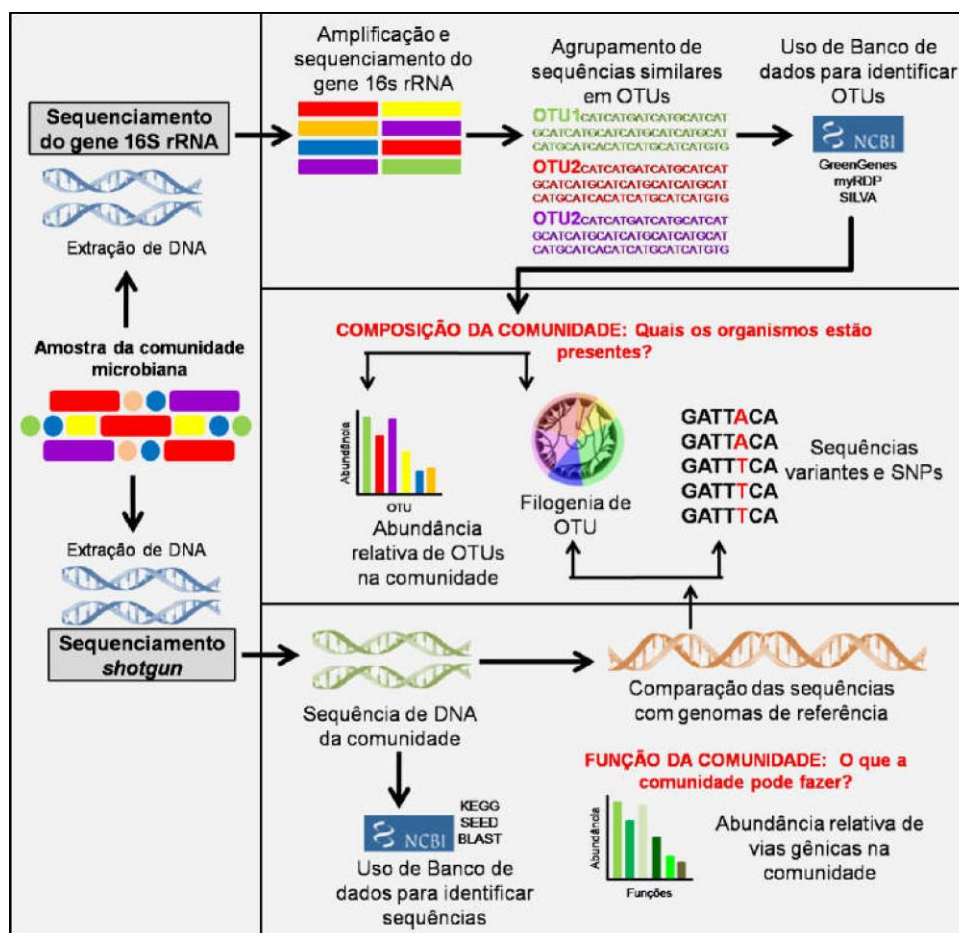


Figura 1. Fluxograma de etapas do sequenciamento metagenômico do gene 16S rRNA e *shotgun*. Adaptado por: Morgan e Huttenhower (2012).

No entanto, o conteúdo genômico de uma comunidade microbiana sugere apenas possíveis ideias sobre seu potencial funcional, mas nenhuma inferência feita sobre as

atividades funcionais que a microbiota está realmente realizando em uma determinada condição ou ponto temporal. Assim, uma ampla gama de abordagens meta-ômicas encontram-se disponíveis para caracterização detalhada da diversidade e compreensão de comunidades microbianas de ambientes, permitindo coletar informações que vão desde sua composição taxonômica (metagenômica), seu potencial funcional (metatranscriptômica), as moléculas produzidas como resultado de seu funcionamento (metaproteômica), até a caracterização do arcabouço metabólico (metametabolômica) (Addis et al., 2016).

2.3.1. Sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento *shotgun*

Como supracitado, o estudo de comunidades microbianas a partir de DNA metagenômico pode ser baseado no sequenciamento alvo do gene 16S rRNA ou sequenciamento aleatório *shotgun*.

Sobre o sequenciamento do gene 16S rRNA, inicialmente, é sabido que os ribossomos procariotos contêm duas subunidades, denominadas 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas além de dois rRNA, 5S e 23S rRNA. A subunidade 30S contém 21 proteínas e a molécula de rRNA 16S. Em particular, 16S rRNA é considerada uma das macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Por essa razão, a análise da sequência do gene 16S RNA ribossomal (rRNA) está entre as técnicas independentes de cultivo mais difundidas para o estudo da diversidade bacteriana (Pedrinho et al., 2009).

Historicamente, a sequência do gene 16S rRNA foi usada pela primeira vez em 1985 pelo pesquisador Carl Woese para análise filogenética (Lane et al., 1985) e foi a partir de então que tornou-se o gene marcador mais amplamente utilizado para o perfil de comunidades bacterianas mistas e complexas (Blaut et al., 2002).

O gene 16S rRNA consiste em 9 regiões hipervariáveis (V1 a V9) que são separadas por nove regiões altamente conservadas (Liu e Stahl, 2007; Wang e Qian, 2009) (Figura 1). Portanto, a sequência do gene que codifica o rRNA pode ser usada para identificar espécies diferentes e estirpes de espécies particulares, dentro de uma comunidade bacteriana, usando tecnologia em série (Furrie, 2006).

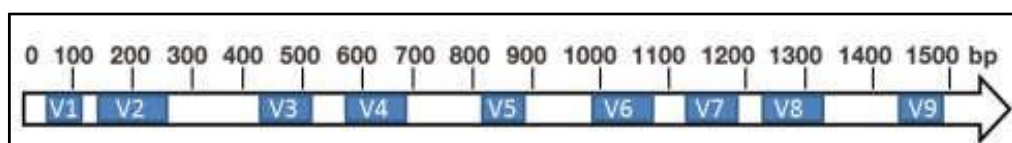


Figura 2. Gene 16S rRNA desenhado com base na sequência de *E. coli* (Brosius et al., 1981; Chakravorty et al., 2007). Marcações em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies bacterianas. Espaços em branco – sequência conservada no domínio Bacteria.

Apenas o uso de técnicas moleculares avançadas, nas quais se podem examinar múltiplos organismos, podem fornecer uma descrição exata da complexidade destas comunidades bacterianas, que é o caso dos sequenciadores de nova geração (Yang et al., 2016), assim, aliado a metagenômica tornaram-se ferramenta fundamental em estudos baseados complexidade de comunidades bacterianas (Hugenholtz e Tyson, 2008).

Nos estudos de sequenciamento do gene 16S rRNA, um par de iniciadores (*primers*) universais é projetado para se ligar a regiões conservadas e amplificar regiões variáveis que capturam a informação taxonômica (através de PCR). O sequenciamento do conjunto amplificado de fragmentos de 16S rRNA permite a atribuição mais precisa de cada leitura para o seu táxon específico, então, a abundância relativa de cada táxon pode ser estimada (Kuczynski et al., 2011).

O sequenciamento de amplicons 16S rRNA oferece a vantagem de ser relativamente barato, rápido e capaz de produzir leituras a partir de uma única região genômica que pode ser geralmente alinhada. Além disso, o fluxo de trabalho de análise de dados para o sequenciamento de amplicons é padronizado (Sanschagrin e Yergeau, 2014). No entanto, limitado pela tecnologia de sequenciamento, as sequências do gene 16S rRNA utilizadas na maioria dos estudos são sequências parciais, portanto, a seleção de *primers* adequados é fundamental para a acurácia desses estudos (Yang et al., 2016). Estudos recentes demonstraram que o uso de pares de iniciadores sub-ótimos resulta na amplificação desigual de certas espécies, causando uma subestimação ou superestimação de algumas espécies em uma comunidade bacteriana (Kim et al., 2011; Klindworth et al., 2013). Yang et al. (2016) estudaram a correlação entre as diferentes regiões hipervariáveis e, relataram que as regiões V4 a V6 foram confiáveis para representar as sequências de 16S rRNA de comprimento total na análise filogenética e classificação taxonômica, enquanto que as regiões V2 e V8 foram as regiões menos confiáveis.

Outro grande problema enfrentado na análise da diversidade de bactérias deste modelo de sequenciamento é a ausência de valores pré-determinados que possam ser usados na determinação das espécies. Infelizmente, nenhuma definição universal existe para identificação de espécies através do gene 16S rRNA (Janda e Abbott, 2007). Para contornar este problema, nos estudos de diversidade microbiana é utilizado o conceito de *Operational Taxonomic Units* (OTU), ou Unidade Taxonômica Operacional, ou ainda Filotipos (Huse et al., 2010; Poretsky et al., 2014). Estas unidades taxonômicas podem referir-se a qualquer nível taxonômico, requerendo apenas uma definição explícita dos seus limites. Por exemplo, identidade maior ou igual a 97% em um alinhamento de fragmentos do gene 16S rRNA, valor

normalmente usado como uma aproximação para espécies, sendo, similaridade maior ou igual a 95%, como uma aproximação para gênero e maior ou igual a 80% como uma aproximação para filo. O uso de OTU é apropriado para comparar riqueza relativa quando sequências do gene 16S rRNA são avaliadas de acordo com a mesma região no gene (Knights et al., 2011).

Para ampliar a informação captada pela metagenômica de amplicons do gene 16S rRNA, a metagenômica *shotgun* fornece outra abordagem que, em vez de amplificar um locus alvo específico, o DNA metagenômico inteiro é extraído, reduzido em fragmentos e sequenciado. Isto resulta em sequências de DNA (isto é, leituras) que se alinham a várias localizações genômicas para a miríade presente na amostra, incluindo vírus e fungos. Como a maioria das regiões do genoma são mais altamente variáveis do que os genes rRNA, os dados do sequenciamento *shotgun* também podem dar uma resolução muito maior, distinguindo entre organismos intimamente relacionados. Com profundidade de sequenciamento suficiente, os dados metagenômicos *shotgun* oferecem a vantagem de fornecer também informações diretas sobre a presença e abundância de rotas de genes funcionais individuais, ou ser montados em genomas de rascunho, fornecendo informações sobre potenciais fisiológicos de organismos abundantes na comunidade. Em contrapartida, o sequenciamento *shotgun* apresenta-se altamente oneroso em relação ao sequenciamento do gene 16S rRNA (Hyde et al., 2017).

Contudo, Ranjan e colaboradores (2016) em estudo comparativo entre os dois métodos relataram que o sequenciamento *shotgun* identificou significativamente mais espécies bacterianas por leitura do que o método 16S rRNA. Em termos de diversidade, utilizando três métricas diferentes (diversidade Shannon, índice Simpson e uniformidade), os mesmos autores relataram que o método *shotgun* apresentou maior diversidade que o 16S. Ainda destacam que, como o método 16S rRNA atribui OTUs com base no amplicon 16S que é usado para prever a classificação de *taxa*, as classificações são mais eficazes em nível de Filo e, em menor grau, em nível de Gênero. Devido a essa limitação, o classificador RDP, por exemplo, frequentemente atribui uma sequência de amplicon 16S a um gênero sem especificar a espécie, já a abordagem *shotgun* pode atribuir classificações confiáveis para muitas sequências ao nível da espécie.

Em suma, a maior limitação do método de amplicons 16S rRNA é que ele sequencia apenas uma única região do genoma bacteriano (16S rRNA), enquanto que o método *shotgun* pode sequenciar regiões amplas do genoma. Recentemente, Marchesi e Ravel (2015) argumentaram em favor de uma distinção terminológica entre metagenômica (usada para descrever uma abrangente abordagem genômica para o perfil de microbioma) e

metataxonomia (que usa amplicons de um gene marcador alvo para fazer inferências taxonômicas, como o gene 16S rRNA).

A análise quantitativa do conteúdo gênico revela as assinaturas de habitats que refletem características específicas de uma amostra ambiental. Em síntese, a metagenômica baseada em estudos de diversidade taxonômica não nos revela informações relativas ao estado de expressão dos genes, sendo assim, o papel funcional de muitos genes ou organismos investigados em determinado ambiente permanecem desconhecidos. Assim, ao constatarem que apenas ela não supriria as necessidades em compreender um organismo, gradativamente as outras Ômicas surgiram, para além de identificar o gene, compreender sua expressão no organismo e também a interrelação com os demais genes (von Mering et al., 2007).

Logo, para superar esse desconhecimento surgiram as novas abordagens metagenômicas, e ampliando a compreensão da dinâmica funcional das comunidades microbianas, sendo elas: a metaproteômica, a metatranscriptômica e a metametabolômica (Urich et al., 2008). A combinação de análises baseadas em DNA, baseadas em mRNA e baseadas em proteínas de comunidades microbianas presentes em diferentes ambientes é uma maneira de elucidar as composições, funções e interações de comunidades microbianas e relacioná-las com processos ambientais. E de maneira global, sendo o metagenoma uma coleção de genomas altamente diversificados em abundância, seu sequenciamento gera extensa quantidade de dados de sequências e a classificação de táxons bem como lidar globalmente com esses enormes e heterogêneos conjuntos de dados são os desafios encontrados na era pós-metagenômica (Godzik, 2011; Sharpton, 2014). A bioinformática, que se torna cada vez mais importante, é responsável por organizar, interpretar, analisar e armazenar todos os dados das Ômicas (Costantini, Autiero e Colonna, 2008).

Uma ampla e constante evolução de ferramentas bioinformáticas para taxonomia e análise funcional está sendo desenvolvida e está disponível em plataformas de *software* livre para análise diferencial, como por exemplo: Mothur (Schloss et al., 2009), QIIME (Caporaso et al., 2010), Galaxy (Goecks, Nekrutenko e Taylor, 2010), MGRAST (Keegan, Glass e Meyer, 2016) Kraken (Wood e Salzberg, 2014), MEGAN (Huson et al., 2007) e LEfSE (Segata et al., 2011). A análise estatística pode então ser realizada em pacotes computacionais tais como o software R, Metastats (Paulson, Pop e Bravo, 2011) e Primer-E (Clarke e Gorley, 2015).

Porém, a evolução do sequenciamento de DNA foi muito mais acelerada do que dos processadores de computadores (Lei de Moore) e a implicação disso é que os sequenciadores evoluíram muito mais rápido do que os computadores que analisam os dados gerados. Com

isso, necessidade computacional para lidar com os dados gerados ter se tornado muito maior do que há 10 anos. Tal crescimento pode ser observado na Figura 3, a qual mostra o crescimento da deposição de dados sequenciados do GenBank (banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI) e que atualmente o número de seqüências acumuladas é superior a 200 milhões e maior que 200 bilhões de pares de base de DNA. A partir de 2001, ano em que houve o lançamento do Sequenciador automático MegaBace 4000, o número de seqüências depositadas começou a aumentar; entretanto, após o ano de 2005, foi lançado os sequenciadores de nova geração da Illumina e da Life Technologies e este crescimento tornou-se efetivamente acentuado.

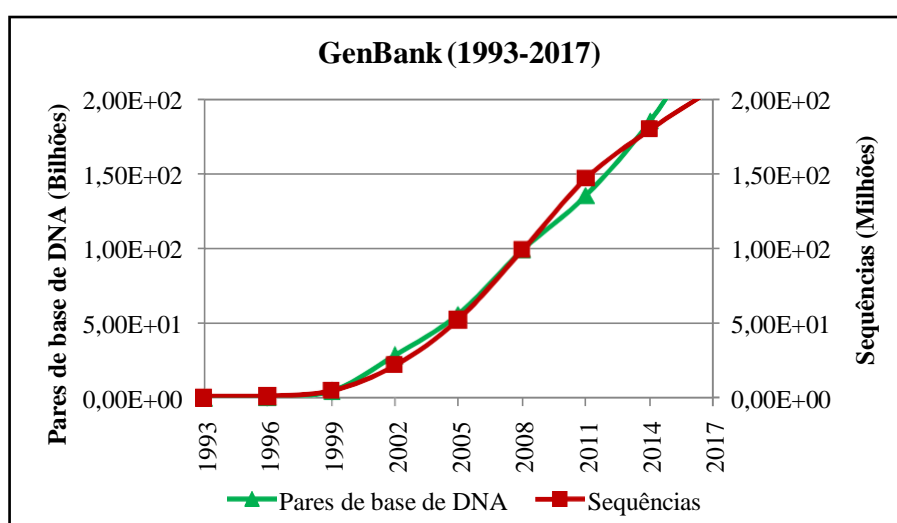


Figura 3. Crescimento do GenBank entre anos de 1993-2017 em número de seqüências depositadas e em pares de base de DNA.

(Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>)

Outro desafio, não menos importante, é a necessidade de profissionais capacitados para guiar estas análises computacionais, mas que também possuam conhecimento biológico; este é o bioinformata. A bioinformática exige profissionais técnicos, capacitados em *software*, especialmente para banco de dados, linguagem de programação, armazenamento, configuração e manutenção de servidores além de conhecimento da biologia (anatomia, genética, patologia e fisiologia, entre outros).

2.4. Microbiota do leite de ruminantes

O leite dentro da glândula mamária em condições sadias era considerado estéril (Tolle, 1980; FAO, 1990) e que os microrganismos encontrados ali após a ordenha resultavam de uma contaminação externa, oriunda de uma variedade de fontes, incluindo a pele e o canal da teta, equipamento de ordenha, ar, água e solo, entre outros (Coorevits et al., 2008; Angulo et

al., 2009; Vacheyrou et al., 2011). Recentemente, com o avanço da evolução dos métodos moleculares mais sensíveis, identificou-se a presença de diversos microrganismos considerados incultiváveis (Rappé e Giovannoni, 2003; Nichols et al., 2010; Hood, 2012; Stewart, 2012).

Logo, o interesse pela compreensão da origem e composição da microbiota do leite tem crescido significativamente na última década e foi o leite materno que impulsionou as primeiras hipóteses e experimentos (Ward et al., 2013; Jost et al., 2014; Jiménez et al., 2015). De fato, a pele e o canal da teta podem conter uma elevada diversidade de bactérias (Braem et al., 2012; Monsallier et al., 2012). Estudos recentes revelaram espécies bacterianas presentes no leite, mas ausentes da microbiota da pele, sugerindo que o leite hospeda uma microbiota única (Hunt et al., 2011; Cabrera-Rubio et al., 2012; Jost et al., 2014). A presença de bifidobactérias que são estritamente anaeróbias reforça a pele como fonte improvável para moldar a microbiota do leite (Gueimonde et al., 2007; Fernández et al., 2013). Com tais evidências, reitera-se a hipótese de que o leite é um ambiente que contém uma população microbiana diversa e complexa (Quigley et al., 2011). Ademais, é sabido que o elevado valor nutritivo e atividade hídrica que o leite apresenta, reforça a promoção para um ambiente ideal para o crescimento de muitos microrganismos (Vacheyrou et al., 2011).

A origem e composição da microbiota do leite são questões ainda não elucidadas, porém, a principal hipótese é que certas bactérias presentes no intestino podem atingir a glândula mamária através de uma via endógena (Perez et al., 2007; Fernández et al., 2013; Donnet-Hughes et al., 2010; Hunt et al., 2011; Khodayar-Pardo et al., 2014; Rodríguez, 2014; Young et al., 2015; Addis et al., 2016).

De maneira paralela, a partir da importância e representatividade que os animais ruminantes retêm na pecuária leiteira mundial, principalmente os bovinos e os caprinos, foram também surgindo pesquisas científicas baseadas no sequenciamento de DNA para elucidação da origem e composição da microbiota do leite destes animais. Corroborando com hipótese supracitada sobre a origem da microbiota do leite humano, Young et al. (2015) relataram a transferência de bactérias intestinais para a glândula mamária em vacas, apoiando a existência de uma via endógena entero-mamária também em ruminantes. Com efeito, os nichos ecológicos não constituem ambientes separados, mas sim uma rede de comunidades inter-relacionadas em constante troca (Costello et al., 2009).

Na literatura, é geralmente aceito que as bactérias ácido-láticas (BAL), um grupo de bactérias que fermenta lactose ao lactato, é uma população dominante no leite das mais variadas espécies de animais. Os gêneros BAL mais comuns no leite incluem *Lactococcus*,

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Quigley et al., 2011; Verdier-Metz et al., 2012; Quigley et al., 2013).

Estudos acerca da microbiota do leite de ruminantes utilizando metodologia independente de cultivo, como metagenômica, são ligeiramente direcionados a espécie bovina uma vez que é a espécie que possui maior abrangência de exploração mundial. Para leite caprino, os estudos são escassos na literatura, porém há algumas pesquisas que revelam populações diversas no leite caprino como listados na Tabela 1. É possível observar que além de microrganismos tipicamente encontrados no leite como as bactérias ácido-láticas também foram identificadas algumas espécies que não estão comumente associadas com leite de cabra, incluindo *Dietzia*, *Shewanella* e *Kocuria*, entre outros.

Tabela 2. Gêneros bacterianos detectados em leite caprino utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo.

Autores	Método*	Resultado (gênero)
Callon et al. (2007)	Cultivo microbiológico, SSCP e RFLP	<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Marococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Ornithinococcus</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pantonea</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Hahella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Delftia</i> , <i>Chryseobacterium</i>
McInnis et al. (2015)	NGS (região V4 do gene 16S rRNA) e Sequenciamento de clones	<i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Aminobacter</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Kocuria</i>
Li et al. (2017)	NGS (regiões V1-V3 do gene 16S rRNA)	<i>Bacillus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rheinheimera</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Propionibacterium</i>

*RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento; NGS: Sequenciamento de próxima geração; SSCP: Polimorfismo de conformação de filamento único.

Callon et al. (2007) avaliaram a estabilidade de comunidades microbianas no leite de cabra durante um ano de lactação por meio da técnica SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism* - Polimorfismo de conformação de uma única linha) e RFLP e observaram que

os leites coletados em diferentes épocas do ano (verão, outono e inverno) apresentaram diferenças significativas em suas populações microbianas. Mais recentemente, utilizando sequenciamento de nova geração para estudar a microbiota do leite caprino, McInnis et al. (2015) relataram que a microbiota no estágio final da lactação foi distinta daquela do início e meio da lactação, sendo Actinobacteria o filo dominante no final da lactação e Proteobacteria diminuindo a partir do meio da lactação.

Li et al. (2017) utilizaram o sequenciamento de próxima geração para caracterizar a microbiota de leite de diferentes ruminantes: o veado da água, a rena e a cabra. Ao final do estudo, reportaram dominância dos gêneros *Bacillus* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp e *Pseudomonas* spp. no leite de cabra, além deste apresentar diversidade bacteriana inferior quando comparado aos demais leites de veados da água e renas. Em contrapartida, os mesmos autores relatam que a composição das bactérias do leite de cabra foi semelhante à observada para o tecido mamário humano e sugere que este fenômeno relaciona-se com adaptação em relação à civilização em conjunto com o processo de domesticação.

Contudo, apesar da variação dos gêneros encontrados no leite de cabra ser atribuída aos diferentes métodos utilizados nos estudos, alguns autores sugeriram que outros fatores podem alterar a microbiota do leite, baseados em estudos com leite bovino, como: presença de infecção intramamária (Oikonomou et al., 2014; Falentin et al., 2016), estágio de lactação (McInnis et al., 2015), práticas de manejo (Aust et al., 2013; Zhang et al., 2014; Kable et al., 2016; Pereira et al., 2016), raça (Bhatt et al., 2012), entre outros.

A mastite causada pela infecção intramamária é uma enfermidade prevalente em animais leiteiros com a maior parte dos casos causada por bactérias promovendo perdas econômicas devido à redução da produção de leite, descarte de leite, menor probabilidade de concepção, abate prematuro e custo com tratamento (Barkema et al., 2009; Hertl et al., 2010; Ma et al., 2015; Peters et al., 2015). A identificação das bactérias responsáveis pela infecção intramamária é, portanto, componente importante para a resolução em casos clínicos e neste sentido os estudos moleculares cultura-independentes vêm contribuindo para o avanço do conhecimento desta enfermidade uma vez que a cultura bacteriana tradicional exibe várias limitações (Almeida et al., 2011; Shittu et al., 2012)

Bhatt et al. (2012) realizaram análise metagenômica de amostras de leite coletadas de bovinos Kankrej, Gir (*Bos indicus*) e mestiços (*Bos taurus* x *B. indicus*) com mastite subclínica e relataram que a caracterização filogenética entre o metagenoma de Kankrej e Gir estavam mais próximos um do outro do que do gado mestiço. Além disso, concluíram que a mastite subclínica não é meramente causada por uma única espécie patogênica de bactérias, e

sim, por uma mistura de vários microrganismos, sendo considerada uma enfermidade “polimicrobiana”. A partir do subsequente estudo de Oikonomou et al. (2012), objetivando a comparação da diversidade microbiana entre amostras de leite de vaca saudáveis e com mastite, o uso de sequenciamento de nova geração foi considerado ferramenta importante no conhecimento sobre a patogênese da mastite bovina.

Kuehn et al. (2013) utilizaram pirosequenciamento de genes bacterianos 16S rDNA, para descrever comunidades bacterianas em amostras de leite bovino mastítico que apresentavam cultura negativa, e identificaram diferenças significativas entre os perfis microbianos destas amostras de leite saudáveis. As abundâncias do gênero *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e *Rashtonia* foram significativamente maiores em leite não mastítico comparado com as amostras com mastite. Em estudo mais recente, Oikonomou et al. (2014) relataram mais detalhadamente a diversidade microbiana de leite bovino oriundos de quartos clinicamente não afetados em diversos valores de contagem de células somáticas. Quatro gêneros foram mais frequentes em amostras saudáveis e sugeriu-se que são parte de uma microbiota saudável do núcleo do leite, a saber, *Faecalibacterium*, Lachnospiraceae - não classificado, *Propionibacterium* e *Aeribacillus*.

No estudo de Falentin et al. (2016) o leite de quartos mamários saudáveis foram associados a uma elevada proporção da classe Clostridia e aqueles com histórico de mastite mostrou maior prevalência da classe Bacilli. Estudos como estes apresentados enfatizam a possível influência da microbiota do leite na saúde da glândula mamária e revelam que o conhecimento do número total de bactérias no leite será útil, por exemplo, para entender o comportamento bacteriano e também para estimar a carga bacteriana em situações de infecções. Isso abriria novas possibilidades para o desenvolvimento de ferramentas potenciais para detecção, tratamento e prevenção de enfermidades no hospedeiro, além de vincular a efetiva relação entre a diversidade bacteriana e demais fatores previamente estudados tais como composição de nutrientes, número de células imunes, entre outros.

Adicionalmente, há indicações de que algumas práticas de manejo têm efeito sobre a microbiota do leite, como o manejo com bezerros leiteiros. Partindo do conhecimento de uma via endógena entero-mamária em ruminantes para a definição da microbiota da glândula mamária, manejos como a administração de leite residual (leite que não é vendido para consumo humano e normalmente deriva de vacas com contagem de células somáticas elevadas e/ou tratadas com antibióticos), apesar de ser vantajoso para o produtor, pode em longo prazo gerar impactos sobre a microbiota do leite de animais maduros. Edrington et al. (2012) e mais tarde Aust et al. (2013) avaliaram o efeito da alimentação de leite residual sobre

a diversidade bacteriana da microbiota fecal de bezerros leiteiros por pirosequenciamento e constataram a depreciação da diversidade microbiana nas amostras fecais quando havia o uso de leite residual. Ambos os autores concluem que a aplicação de pasteurização no leite residual antes de ser fornecido garante uma alimentação aceitável, sem riscos à saúde e ao desempenho do bezerro leiteiro.

Além disso, quando existem resíduos de antibiótico nos leites residuais administrados, há também probabilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos gerando um possível “resistoma” tanto para a microbiota intestinal como para a glândula mamária, devido ao transporte paralelo (Addis et al., 2016). Van Vleck Pereira et al. (2016), por NGS, avaliaram a microbiota fecal de bezerros leiteiros alimentados com leite cru contendo concentrações residuais de ampicilina, ceftiofur, penicilina e oxitetraciclina, ou seja, concentrações abaixo do limiar definido pelo FDA (*Federal Department of Agriculture*, EUA) e relataram redução da microbiota desses animais a nível de gênero. Concluiu-se que, apesar de mínimas, as concentrações de antibióticos podem gerar impacto seletivo na competição na comunidade bacteriana, influenciando o equilíbrio final entre as populações microbianas sensíveis e resistentes, ou seja, proporcionando vantagem seletiva aos microrganismos que carregam genes de resistência a antibióticos.

Outra prática de manejo refere-se à terapia antibiótica intramamária em animais leiteiros durante o período seco ou durante a lactação. Rotineiramente, muitos rebanhos leiteiros realizam esta prática como manejo preventivo às infecções intramamárias sem triagem laboratorial para decisão de qual animal tratar e qual microrganismo será alvo, sugerindo uma seleção potencial na disseminação de genes de resistência a antibióticos. Portanto, fazem-se necessárias investigações acerca do impacto desta prática sobre a microbiota do leite.

O manejo alimentar de animais é um dos pontos cruciais nas produções leiteiras, uma vez que, se bem alimentados com dietas balanceadas corretamente, os animais leiteiros produzem mais leite. Neste sentido, Zhang et al. (2015) avaliaram o efeito de dietas com diferentes composições de concentrado (concentrado alto x concentrado baixo) sobre a comunidade microbiana no leite bovino através do uso de pirosequenciamento do gene 16S rRNA. Nesse estudo, observaram que os animais que recebiam elevado nível de concentrado, com subsequente distúrbio metabólico (acidose), apresentaram maior proporção de bactérias patogênicas causadoras de mastite, como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus parauberis* e *Brevundimonas diminuta*, indicando que o risco de mastite pode ser maior para as vacas leiteiras com este distúrbio metabólico. Os autores ainda destacam a necessidade de

se investigar fisiologicamente a função da barreira mamária, bem como averiguar mudanças na microbiota do leite durante a adaptação a uma dieta concentrada para descobrir os indicadores de saúde mamária entre os animais leiteiros.

Em suma, a análise dos padrões microbianos do leite é essencial para compreender a sua funcionalidade, seja para fins de preparação de produtos lácteos ou para assegurar a saúde e desempenho dos animais de produção leiteira. Como exposto, é essencial estudos profundos mais detalhados sobre esta microbiota, uma vez que progressos na produção de leite dependem do maior conhecimento dos aspectos biológicos subjacentes à lactação desses animais.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o advento do sequenciamento de nova geração de paralelo ao estudo metagenômico, importantes avanços no estudo de comunidades microbianas nos mais diferentes habitats foram possíveis, expondo a variedade e complexidade dos microrganismos que habitam diferentes ambientes e animais vivos, bem como, suas interações com o ambiente e o hospedeiro.

Após o descobrimento de que a glândula mamária saudável e o leite nela contido abarcavam uma comunidade microbiana diversa, vários estudos foram direcionados para identificação, entendimento e importância desta microbiota intramamária obscura. O leite materno impulsionou as primeiras hipóteses e experimentos, e recentemente, seguindo estes estudos sobre ecologia do leite, abordagens metagenômicas começaram a ser aplicadas também sobre o leite de ruminantes. O leite de vaca, por sua vez, vem sendo alvo de inúmeros trabalhos que aplicam tecnologia de sequenciamento de última geração, havendo escassez de estudos com leite de outras espécies. As ferramentas de investigação como a metagenômica permitem acesso a informações antes não reveladas, podendo ser a chave para o avanço da melhoria para as indústrias de animais leiteiros.

Como resultado, cada vez mais há a evidência da importância da microbiota do leite na fisiologia e saúde do animal leiteiro. Considerando-se as implicações econômicas que tais descobertas podem ter na produção e indústria de animais leiteiros, abordagens metagenômicas tornam-se imprescindíveis para a melhoria da compreensão de questões ainda não elucidadas no ramo, auxiliando de maneira eficaz descoberta de novas ferramentas com efetivo potencial biológico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIS, M. F.; TANCA, A.; UZZAU, S.; *et al.* The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular bioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 2016.
- AGUIAR-PULIDO, V.; HUANG, W.; SUAREZ-ULLOA, V.; *et al.* Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 12, n. Suppl 1, p. 5–16, 2016.
- ALMEIDA, A. C.; SOARES, T. M. P.; SILVA, D. B.; *et al.* Atividade de bioterápicos para o tratamento de mastite subclínica bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology, by Robert S. Breed [and others]**. 7th ed. ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1957
- ANGULO, F. J.; LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 93–100, 2009.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 1986.
- AUST, V.; KNAPPSTEIN, K.; KUNZ, H.-J.; *et al.* Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1091–1103, 2013.
- BAILLY, J.; FRAISSINET-TACHET, L.; VERNER, M.; *et al.* Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. **The ISME journal**, v. 1, n. 7, p. 632–642, 2007.
- BARKEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; *et al.* The role of contagious disease in udder health. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 4717–4729, 2009.
- BHATT, V. D.; AHIR, V. B.; KORINGA, P. G.; *et al.* Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 639–650, 2012.
- BLASER, M. J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 887–894, 2009.
- BLAUT, M.; COLLINS, M. D.; WELLING, G. W.; *et al.* Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. **The British Journal of Nutrition**, v. 87 Suppl 2, p. S203–211, 2002.
- BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; VERBIST, B.; *et al.* Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3–4, p. 383–390, 2012.
- BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; *et al.* Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 148, n. 2, p. 107–127, 1981.
- CABRERA-RUBIO, R.; COLLADO, M. C.; LAITINEN, K.; *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544–551, 2012.

- CALLON, C.; DUTHOIT, F.; DELBÈS, C.; *et al.* Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547–560, 2007.
- CAO, B.; STOUT, M. J.; LEE, I.; *et al.* Placental Microbiome and Its Role in Preterm Birth. **NeoReviews**, v. 15, n. 12, p. e537–e545, 2014.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; *et al.* A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.
- CHEVREUX, B.; PFISTERER, T.; DRESCHER, B.; *et al.* Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1147–1159, 2004.
- CHO, I.; BLASER, M. J. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 4, p. 260–270, 2012.
- CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N.; PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, **Plymouth**, 2015.
- COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; *et al.* Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 126–140, 2008.
- COSTANTINI, S.; AUTIERO, I.; COLONNA, G.. On new challenge for the Bioinformatics. **Bioinformation**, v. 3, n. 5, p. 238–239, 2008.
- COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; *et al.* Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 2009.
- DALMASSO, A.; SOTO DEL RIO, M. D.; CIVERA, T.; *et al.* Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 490–496, 2016.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.
- DELCENSERIE, V.; TAMINIAU, B.; DELHALLE, L.; *et al.* Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6046–6056, 2014.
- DONNET-HUGHES, A.; PEREZ, P. F.; DORÉ, J.; *et al.* Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 407–415, 2010.
- EDRINGTON, T. S.; DOWD, S. E.; FARROW, R. F.; *et al.* Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4519–4525, 2012.
- ENTCHEVA, P.; LIEBL, W.; JOHANN, A.; *et al.* Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 89–99, 2001.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; *et al.* Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>. Acesso em: 09 fevereiro 2018.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milking, milk production hygiene and udder health. FAO Animal Production & Health Paper (www.fao.org), 1990.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1–10, 2013.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 141–143, 2006.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 759–769, 2011.

GODZIK, A. Metagenomics and the protein universe. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 3, p. 398–403, 2011.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, v. 11, p. R86, 2010.

GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; *et al.* Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v. 92, n. 1, p. 64–66, 2007.

HALL, N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. Pt 9, p. 1518–1525, 2007.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–249, 1998.

HE, Z.; GENTRY, T. J.; SCHADT, C. W.; *et al.* GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. **The ISME journal**, v. 1, n. 1, p. 67–77, 2007.

HERTL, J. A.; GRÖHN, Y. T.; LEACH, J. D. G.; *et al.* Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1551–1560, 2010.

HOOD, L. Tackling the Microbiome. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1209–1209, 2012.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Microbiology: Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481–483, 2008.

HUNT, K.M.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J.; *et al.* Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21313, 2011.

HUSE, S. M.; WELCH, D. M.; MORRISON, H. G.; *et al.* Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 1889–1898, 2010.

- HUSON, D. H.; AUCH, A. F.; QI, J.; *et al.* MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome Research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, 2007.
- HYDE, E. R. , SANDRES, J., TRIPATHI, A., *et al.* Comparing 16S rRNA Marker Gene and Shotgun Metagenomics Datasets in the American Gut Project Using State of the Art Tools. **Digestive Disease Week®**, **Microbiome Active Learning Session 200**, 2017.
- JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.
- JIMÉNEZ, E.; DE ANDRÉS, J.; MANRIQUE, M.; *et al.* Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. **Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association**, v. 31, n. 3, p. 406–415, 2015.
- JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C. P.; *et al.* Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.
- KABLE, M. E.; SRISENGFA, Y.; LAIRD, M.; *et al.* The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e00836-16, 2016.
- KATO, C.; LI, L.; TAMAOKA, J.; *et al.* Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench. **Extremophiles**, v. 1, n. 3, p. 117–123, 1997.
- KEEGAN, K. P.; GLASS, E. M.; MEYER, F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1399, p. 207–233, 2016.
- KHODAYAR-PARDO, P.; MIRA-PASCUAL, L.; COLLADO, M. C.; *et al.* Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association**, v. 34, n. 8, p. 599–605, 2014.
- KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 1, p. 81–87, 2011.
- KLASSEN, J. L.; CURRIE, C. R. Gene fragmentation in bacterial draft genomes: extent, consequences and mitigation. **BMC genomics**, v. 13, p. 14, 2012.
- KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1, 2013.
- KNIGHTS, D.; PARFREY, L. W.; ZANEVELD, J.; *et al.* Human-associated microbial signatures: examining their predictive value. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 292–296, 2011.
- KUCZYNSKI, J.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; *et al.* Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 1, p. 47–58, 2011.
- KUEHN, J. S.; GORDEN, P. J.; MUNRO, D.; *et al.* Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61959, 2013.
- LANE, D J; PACE, B; OLSEN, G J; *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 20, p. 6955–6959, 1985.

- LÉRIAS, J. R.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; SUÁREZ-TRUJILLO, A.; *et al.* The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production--a review. **The Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 3, p. 304–318, 2014.
- LI, Z.; WRIGHT, A. G.; YANG, Y.; *et al.* Unique Bacteria Community Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40950, 2017.
- LIU, W.; STAHL, D. A. Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity, and Phylogeny. p. 139–156, 2007.
- LLOYD-PRICE, J.; ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v. 8, p. 51, 2016.
- MA, C.; ZHAO, J.; XI, X.; *et al.* Bovine mastitis may be associated with the deprivation of gut *Lactobacillus*. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 1, p. 95–102, 2015.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, p. 31, 2015.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–380, 2005.
- MCDERMOTT, J. J.; STAAL, S. J.; FREEMAN, H. A.; *et al.* Sustaining intensification of smallholder livestock systems in the tropics. **Livestock Science**, v. 130, n. 1–3, p. 95–109, 2010.
- MCINNIS, E. A.; KALANETRA, K. M.; MILLS, D. A.; *et al.* Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. **Food Microbiology**, v. 46, p. 121–131, 2015.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.
- MONSALLIER, F.; VERDIER-METZ, I.; AGABRIEL, C.; *et al.* Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 3, p. 265–278, 2012.
- MOR, G.; KWON, J. Trophoblast-microbiome interaction: a new paradigm on immune regulation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4 Suppl, p. S131-137, 2015.
- MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 12, p. e1002808, 2012.
- NEVIANI, E.; BOTTARI, B.; LAZZI, C.; *et al.* New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- NICHOLS, D.; CAHOON, N.; TRAKHTENBERG, E. M.; *et al.* Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2445–2450, 2010.
- OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA, E.; *et al.* Microbiota of Cow’s Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.
- OIKONOMOU, G.; MACHADO, V. S.; SANTISTEBAN, C.; *et al.* Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47671, 2012.

- OLIVER, S. P.; BOOR, K. J.; MURPHY, S. C.; *et al.* Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, 2009.
- ORPHAN, V. J.; TAYLOR, L. T.; HAFENBRADL, D.; *et al.* Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 700–711, 2000.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5313, p. 734–740, 1997.
- PATEL, S. H.; VAIDYA, Y. H.; JOSHI, C. G.; *et al.* Culture-dependent assessment of bacterial diversity from human milk with lactational mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 437–443, 2016.
- PAULSON, J. N.; POP, M.; BRAVO, H. C. Metastats: an improved statistical method for analysis of metagenomic data. **Genome Biology**, v. 12, n. Suppl 1, p. P17, 2011.
- PEDRINHO, E. A. N. *et al.* AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO LODO DE ESGOTO NA MICROBIOTA DO SOLO UTILIZANDO O GENE 16S rRNA. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 447–452, 2009.
- PEREIRA, R. V. V.; LIMA, S.; SILER, J. D.; *et al.* Ingestion of Milk Containing Very Low Concentration of Antimicrobials: Longitudinal Effect on Fecal Microbiota Composition in Preweaned Calves. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.
- PEREZ, P. F.; DORÉ, J.; LECLERC, M.; *et al.* Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. e724–732, 2007.
- PETERS, M. D. P.; SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, v. 9, n. 12, p. 2024–2028, 2015.
- PORETSKY, R.; RODRIGUEZ-R, L. M.; LUO, C.; *et al.* Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.
- QUAIL, M. A.; SMITH, M.; COUPLAND, P.; *et al.* A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC Genomics**, v. 13, p. 341, 2012.
- QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; *et al.* Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2–3, p. 81–94, 2011.
- QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; STANTON, C.; *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.
- RANJAN, R.; RANI, A.; METWALLY, A.; *et al.* Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 4, p. 967–977, 2016.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369–394, 2003.
- RODRÍGUEZ, J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 6, p. 779–784, 2014.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANSCHAGRIN, S.; YERGEAU, E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 90, 2014.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J.. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, p. 229, 2005.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; *et al.* Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R60, 2011.
- SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 209, 2014.
- SHITTU, A.; ABDULLAHI, J.; JIBRIL, A.; *et al.* Sub-clinical mastitis and associated risk factors on lactating cows in the Savannah Region of Nigeria. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 134, 2012.
- SILASI, M.; CARDENAS, I.; KWON, J.; *et al.* Viral infections during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 73, n. 3, p. 199–213, 2015.
- SILVA, R. A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B.; *et al.* Evaluation of the bacterial microbiota of the artisanal “Coalho” of cheese produced in Agreste Region of the State of Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1732–1738, 2012.
- SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.
- SOUZA, L. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILEA, J. A. Importância das Ômicas como Ferramentas para o Estudo da Prospecção de Microrganismos: Perspectivas e Desafios. **Uningá Review**, v. 18, n. 2, p. 16-21, 2014.
- STEWART, E. J. Growing Unculturable Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–4160, 2012.
- TOLLE, A. The microflora of the udder. **Bull Int Dairy Fed**, v. 120, p. 4, 1980.
- TRÜPER, H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity & Conservation**, v. 1, n. 4, p. 227–236, 1992.
- URBANIAK, C.; ANGELINI, M.; GLOOR, G. B.; *et al.* Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, p. 1, 2016.
- URICH, T. LANZÉN, A.; QI, J.; *et al.* Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. **PloS One**, v. 3, n. 6, p. e2527, 2008.
- URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; *et al.* Defining the Human Microbiome. **Nutrition reviews**, v. 70, n. Suppl 1, p. S38–S44, 2012.

- VACHEYROU, M.; NORMAND, A.; GUYOT, P.; *et al.* Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 253–262, 2011.
- VAN VLECK PEREIRA, R.; LIMA, S.; SILER, J. D.; *et al.* Ingestion of Milk Containing Very Low Concentration of Antimicrobials: Longitudinal Effect on Fecal Microbiota Composition in Preweaned Calves. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.
- VERDIER-METZ, I.; GAGNE, G.; BORNES, S.; *et al.* Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 326–333, 2012.
- VON MERING, C.; HUGENHOLTZ, P.; RAES, J.; *et al.* Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5815, p. 1126–1130, 2007.
- WANG, Y.; QIAN, P. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PloS One**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.
- WARD, T. L.; HOSID, S.; IOSHIKHES, I.; *et al.* Human milk metagenome: a functional capacity analysis. **BMC microbiology**, v. 13, p. 116, 2013.
- WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, v. 15, p. R46, 2014.
- XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713–1731, 2006.
- YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, p. 135, 2016.
- YOUNG, W.; HINE, B. C.; WALLACE, O. A. M.; *et al.* Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, p. e888, 2015.
- ZHANG, R.; HUO, W.; ZHU, W.; *et al.* Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 1072–1079, 2015.

CAPÍTULO II

Artigo científico:

Caracterização da microbiota do leite caprino em diferentes períodos de lactação

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LEITE CAPRINO EM DIFERENTES PERÍODOS DE LACTAÇÃO

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo determinar a comunidade microbiana do leite caprino ao longo da lactação em animais livres de infecção intramamária utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA. Para tanto, o leite foi coletado a partir de dezesseis cabras leiteiras mestiças e multíparas em uma propriedade localizada no semiárido Paraibano, em três períodos de lactação: inicial (50 dias), intermediário (100 dias) e final (150 dias). Lactocultura e contagem bacteriana total (CBT) foram realizadas a fim selecionar apenas amostras de leite oriundas de glândulas mamárias sem infecção intramamária (ausência de mastite clínica e subclínica). A composição química (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) e a contagem de células somáticas (CCS) e foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Após a extração de DNA foi feita a amplificação das regiões V3-V5 do gene 16S rRNA foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* gerados. A diversidade alfa foi estimada pelos índices de Chao1 e Shannon e submetida à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). A diversidade beta foi estimada pelas métricas Unifrac não-ponderada e Bray-Curtis e submetidas à análise de variância permutativa multivariada (PERMANOVA). Análise de abundância diferencial foi realizada no pacote edgeR com taxa de descoberta falsa (FDR) (5% de probabilidade). Quarenta e nove (49/96) amostras de leite apresentaram ausência de infecção intramamária e foram encaminhadas ao sequenciamento de DNA, sendo 22, 16 e 11 amostras de leite, respectivamente, para os períodos lactacionais inicial, intermediário e final. A composição química do leite foi diferente ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação. Os teores de gordura e sólidos totais superiores no final da lactação enquanto que o teor de lactose foi superior no período inicial da lactação. Já o teor de proteína foi superior aos 100 dias de lactação (período intermediário). As bactérias presentes no leite cru de cabra pertenciam predominantemente a três principais filos: Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria e apesar de não apresentarem diferença entre os períodos de lactação avaliados, suas proporções variaram ao longo da lactação. Actinobacteria apresentou maior abundância no período inicial e final da lactação, inversamente aos filos Firmicutes e Proteobacteria, que revelaram proporções inferiores nos mesmos períodos lactacionais. *Nocardioide*s foi o gênero bacteriano mais abundante independente do período de lactação. Porém, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* foram mais abundantes no período de lactação intermediário (FDR < 0.05 na análise de expressão diferencial) e isto, possivelmente esteja associado ao teor de proteína superior neste mesmo período lactacional. Os gêneros *Staphylococcus* e *Sphingomonas* foram mais abundantes no final da lactação, sugestivamente, dado ao aumento do teor de gordura e CCS neste mesmo período de lactação. As alterações que ocorrem na comunidade microbiana do leite caprino ao longo da lactação são importante na manutenção da ecologia do leite e saúde animal.

Palavras-chave: cabras, metagenômica, sequenciamento de próxima-geração

CHARACTERIZATION OF CAPRINE MILK MICROBIOTES IN DIFFERENT LACTATION PERIODS

ABSTRACT: The present study aimed to determine the microbial community of the goat milk during lactation in animals free of intramammary infection using 16S rRNA gene sequencing. For this, the milk was collected from sixteen crossbred and multiparous dairy goats in a property located in the Paraíba semi-arid region, in three lactation periods: initial (50 days), intermediate (100 days) and final (150 days). Lactoculture and total bacterial counts (TBC) were performed in order to select only milk samples from mammary glands without intramammary infection (absence of clinical and subclinical mastitis). The chemical composition (fat, protein, lactose and total solids) and somatic cell counts (SCC) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means comparison was done by the Tukey test at the 5% probability level. After the DNA extraction was done the amplification of the V3-V5 regions of the 16S rRNA gene was performed the sequencing of the amplicons generated. The alpha diversity was estimated by Chao1 and Shannon indices and submitted to analysis of variance and means comparison by Tukey's test (5% probability). The beta diversity was estimated by the non-weighted Unifrac and Bray-Curtis metrics and subjected to multivariate analysis of permutative variance (PERMANOVA). Differential abundance analysis was performed on the edgeR package with false detection rate (FDR) (5% probability). Forty-nine (49/96) samples of milk showed no intramammary infection and were sent to DNA sequencing, being 22, 16 and 11 milk samples, respectively, for the initial, intermediate and final lactation periods. The chemical composition of the milk was significantly different ($p < 0.05$) between the lactation periods. Fat contents and total solids were higher at the end of lactation while lactose content was higher in the initial lactation period. The protein content was higher than 100 days of lactation (intermediate period). The bacteria present in raw goat milk belonged predominantly to three main phyla: Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria and although they did not present statistical difference between the evaluated lactation periods, their proportions varied throughout lactation. Actinobacteria showed greater abundance in the initial and final lactation period, inversely to the phyla Firmicutes and Proteobacteria, which showed lower proportions in the same lactational periods. *Nocardioides* was the most abundant bacterial genus independent of the lactation period. However, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were statistically more abundant in the intermediate lactation period (FDR < 0.05 in the differential expression analysis) and this is possibly associated with a significantly higher protein content in the same lactation period. The genera *Staphylococcus* and *Sphingomonas* were more abundant at the end of lactation, suggestively, given the increase in fat content and SCC in this same period of lactation. The changes that occur in the microbial community of goat milk throughout lactation are important in the maintenance of milk ecology and animal health.

Keywords: goats, metagenomics, next-generation sequencing

1. INTRODUÇÃO

O leite contém componentes bioativos, macronutrientes, e proteínas de defesa do hospedeiro (Hettinga et al., 2011) e sabe-se que o perfil microbiano encontrado no leite impacta diretamente na qualidade e vida útil do leite como matéria-prima, bem como, o desenvolvimento subsequente e qualidade dos derivados lácteos (Oliver et al., 2009; Quigley et al., 2013). Pode, ainda, fornecer uma visão sobre a sanidade dos animais lactantes em resposta a infecções como a mastite.

Através da lactocultura, método padrão-ouro na identificação de microorganismos, a comunidade microbiana encontrada no leite era dominada por bactérias do ácido láctico (BAL) e outros microrganismos encontrados ali eram resultado, principalmente, de contaminação externa adquirida oriunda de várias fontes, incluindo a teta, o equipamento de ordenha ou as mãos de ordenhador, o ar, a água, a alimentação, a grama, o solo, entre outros ambientes (Lejeune & Rajala-Schultz, 2009; Vacheyrou et al., 2011; Quigley et al., 2011).

No entanto, algumas pesquisas mostraram que o leite, mesmo no tecido mamário saudável de mulheres, é dominado por uma microbiota complexa a qual interage com nutrientes e com as células do hospedeiro (Hunt et al., 2011; Hood, 2012; Fernández et al., 2013; Urbaniak et al., 2014). Tais descobertas foram possíveis devido a progressos recentes e significativos em técnicas independentes de cultivo, em particular, a metagenômica em paralelo ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Essas técnicas surgem como alternativa e tem fundamentado inúmeras abordagens para a caracterização detalhada da microbiota do leite, permitindo identificar e quantificar com resolução de tempo e espaço, independentemente do cultivo prévio de microrganismos (Souza et al., 2014).

Durante a lactação, os animais leiteiros são submetidos a várias alterações fisiológicas e metabólicas, de forma a garantir a produção de leite, distinguindo-se três períodos compreendidos na curva de lactação. Por consequência, o período de lactação representa importante fonte de variação que afeta a produção de leite, havendo estreita associação entre o volume e a qualidade de leite total produzido por lactação. Essa variação desempenha um papel fundamental nas etapas iniciais da colonização do intestino neonatal, na maturação do sistema imunológico da cria e na redução da incidência e gravidade de infecções em lactentes (Borburema et al., 2013; Assan, 2014; Broucek et al., 2015). Portanto, a compreensão da composição e dinâmica da microbiota encontrada no leite é fundamental, podendo revelar redes microbianas importantes que interagem para a manutenção da ecologia do leite e da saúde (Ma et al., 2015).

Os animais ruminantes representam não apenas o grupo mais importante de grandes mamíferos herbívoros terrestres, mas também o grupo de animais leiteiros mais explorados na agropecuária mundial, como vacas, cabras, ovelhas e bufálas, entre outros. A bovinocultura leiteira, por sua importância econômica mundial, abarca extensivos estudos caracterizando a microbiota e a funcionalidade de moléculas presentes no leite, principalmente quando relacionadas à mastite (Kuehn et al., 2013; Oikonomou et al., 2014; Zhang et al., 2015; Falentin et al., 2016). Todavia, a expansão da caprinocultura leiteira mundialmente e em especial no Brasil é notória, um dos maiores produtores de leite de cabra da América Latina, com produção ao redor de 250 mil toneladas no ano de 2017 (FAOSTAT, 2018). A região nordeste detém mais de 80% do rebanho caprino brasileiro cerca de 8 milhões de cabeças e responde com produção superior a 22 mil litros de leite de cabra ao ano, caracterizando-se como atividade pecuária crescente e promissora para o setor nessa região (IBGE, 2017).

Isto posto, o presente estudo objetivou caracterizar e elucidar a microbiota do leite ao longo de diferentes períodos de lactação de cabras sem infecção intramamária baseado no sequenciamento do gene 16S rRNA,

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e delineamento experimental

Foram coletadas amostras de leite a partir de dezesseis (n=16) cabras leiteiras mestiças e multíparas pertencentes a uma propriedade situada no município paraibano de Gurjão. O município está localizado na microrregião do Cariri oriental paraibano, entre as coordenadas 07°14'48" (S) e 36°29'22" (W). De acordo com a classificação climática de Koppen, o clima do município é do tipo Bsh - semiárido quente (quente e seco), com temperaturas mínimas que variam de 18 a 22°C (meses de julho e agosto) e temperaturas máximas entre 28 e 31°C (meses de novembro e dezembro) e precipitação pluvial média anual inferior a 400 mm (Alves, Azevedo e Farias, 2015).

Os animais eram alimentados a pasto em campo nativo no bioma caatinga com predominância das espécies jurema, facheiro e macambira. Suplementação concentrada ou volumosa era administrada no final da tarde, e os animais eram criados em sistema semi-extensivo e submetidos à ordenha manual matutina única. O leite foi colhido respeitando-se a rotina do manejo animal da propriedade (ordenha manual e matutina) por três vezes em intervalos de 50 dias a fim de caracterizar três diferentes períodos lactacionais: período inicial (50 dias), intermediário (100 dias) e final (150 dias).

Foram seguidas as recomendações do *National Mastitis Council* (NMC, 2004) para a coleta de leite. Antes da amostragem, as extremidades das tetas foram cuidadosamente lavadas com água clorada e posteriormente limpas com álcool etílico 70%. Os primeiros jatos retirados foram descartados e aproximadamente 50 ml de leite de cada glândula mamária foram coletados em tubos estéreis individualmente, refrigeradas e encaminhadas para o laboratório para análises posteriores.

Com o objetivo de proporcionar boa qualidade de ajuste ao modelo de predição calculado, optou-se por incluir neste estudo apenas amostras de leite oriundas de glândulas saudáveis, de acordo com os seguintes requisitos: (a) animais sem sinais de doença clínica; (b) ausência de mastite clínica (exames de palpação e inspeção para detecção de sinais clínicos visíveis); (c) lactocultura negativa (diagnóstico padrão-ouro para mastite subclínica), sendo considerado lactocultura positiva quando houve o crescimento de três ou mais colônias não hemolíticas, ou apenas uma colônia hemolítica.

2.2. Análises laboratoriais

Lactocultura

A lactocultura das amostras de leite foi realizada por semeadura do mesmo, em ágar sangue de carneiro à 5% desfibrinado e incubadas a 37 °C em aerobiose, verificando-se o crescimento bacteriano após 24, 48 e 72 horas. Com base nas características morfológicas e tintórias, e presença de atividade hemolítica, as bactérias foram identificadas e isoladas em ágar tripton de soja (TSA) e submetidas à verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram, teste da catalase e coagulase em tubo (NMC, 2004).

Contagem bacteriana total (CBT) e Contagem de células somáticas (CCS)

A contagem bacteriana total de bactérias aeróbias mesófilas (CBT) foi realizada segundo recomendações da *American Public Health Association* (APHA, 1992). As amostras foram diluídas seriadamente em água peptonada (0,1%) e alíquotas (1 mL) foram semeadas em ágar padrão para contagem (PCA), incubadas a 37 °C por 48 horas. O número total de microrganismos foi expresso em UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro). A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada por microscopia direta segundo a metodologia descrita por Prescott e Breed (1910), tendo como suporte o guia proposto pela *National Conference on Interstate Milk Shipments* (2005).

Composição química

As determinações dos teores de proteína, gordura, lactose e sólidos totais foram realizadas por absorção infravermelha utilizando-se o equipamento Bentley 2000 (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995). As amostras de leite destinadas a essa análise continham o conservante bronopol a 4%.

Análise dos dados

As análises de variâncias para composição química do leite e CCS foram feitas pelo programa de análises estatísticas SISVAR 5.6 (Ferreita, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de CCS foram logaritmicamente (log10) transformados.

2.3. Análises moleculares

Extração de DNA

O protocolo de extração foi realizado pelo kit comercial Powersoil™ DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, a partir amostras de leite previamente tratadas com lisozima e proteinase K para maximização da lise da parede celular microbiana. Inicialmente, as amostras de leite (15 mL) foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante e ao precipitado obtido foi adicionado 1 mL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA). Dessa mistura retirou-se 500 µL e transferiu-se para microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL), homogeneizou-se a solução em vórtex e esta foi incubada em banho-maria a 55°C/2h. Em seguida, transferiu-se todo o conteúdo para tudo *PowerBead* (fornecido pelo kit) e prosseguiu-se os passos do kit comercial.

O DNA extraído foi avaliado quali-quantitativamente por espectrofotometria de micro volume em aparelho Colibri (Titertek-Berthold, Germany) e sua integridade avaliada visualmente em gel de agarose (1%). As amostras de DNA foram então estocadas em kit de armazenamento GenTegra (cat. nº GTD0001, Pleasanton, CA, EUA) segundo instruções do fabricante com posterior secagem em dessecador acoplado em bomba de vácuo durante 5 horas, e enviadas para sequenciamento.

Sequenciamento do gene 16S rRNA e bioinformática

Quarenta e nove (n=49) amostras de leite distribuídas para os diferentes períodos de lactação apresentaram em acordo com os requisitos de seleção para este estudo (ausência de mastite clínica e ausência de infecção intramamária a partir da lactocultura negativa) e foram encaminhadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA. Dessas, 22, 16 e 11 amostras de leite, respectivamente, compunham os períodos lactacionais inicial, intermediário e final.

O sequenciamento foi realizado na Unidade de Sequenciamento de Larga Escala (*High-Through put Sequencing and Genotyping Unit*) do Centro de Biotecnologia Roy J. Carver da UIUC (Urbana, EUA). A amplificação das regiões V3 e V5 do gene 16S rRNA foi realizada utilizando-se os iniciadores V3 F357 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG) e V5 R926 (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT), com o auxílio do sistema *IFC Access array* (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA). A reação de amplificação foi realizada no sistema *FCI Cycler* (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA).

As bibliotecas foram purificadas com kit comercial AMPure XP beads (Illumina, San Diego, CA, EUA), quantificadas por RT-qPCR e sua qualidade avaliada com o kit High density DNA Assay no equipamento FragmentAnalyzer (AdvancedAnalytical Technologies Inc, Ankeny, Iowa, USA). O DNA de PhiX foi adicionado nas amostras como controle para as corridas MiSeq (kit PhiX, Illumina), na concentração mínima de 5%. O sequenciamento foi realizado em única flowcell de MiSeq para 301 ciclos de cada extremidade dos fragmentos, utilizando-se kit de sequenciamento de 600 ciclos para MiSeq V3 (Illumina), de acordo com recomendações do fabricante. As sequências produzidas apresentaram 300 pb de comprimento.

Os dados brutos foram processados conforme recomendação do *Brazilian Microbiome Project* (Pylro et al., 2014), com algumas atualizações que incluem a substituição o uso do programa USEARCH (Edgar, 2010) pelo VSEARCH (Rognes et al., 2016) (disponível em: <http://www.brmicrobiome.org/16sillumina>), através do Sistema Operacional BMP (Pylro et al., 2016). O agrupamento de sequências com 97% de corte de similaridade, e em seguida, as sequências foram alinhadas contra o banco de dados de referência SILVA (Quast et al., 2013) (versão 132).

Análise dos dados

A visualização dos dados foi realizada exclusivamente em R e as análises estatísticas foram realizadas usando uma combinação de scripts QIIME e R (R Core Team, 2016). Para

análise feita em R, as tabelas de OTUs rarefeitas foram convertidas para o formato json e exportadas para análise de diversidade e expressão diferencial.

Diversidade alfa foi calculada utilizando o pacote *ggplot2* (Wickham, 2011), e gerada pelas métricas de diversidade: Chao1 (Chao, 1984) e Shannon (Shannon & Weaver, 1949). O índice de Chao1 considera apenas a riqueza bacteriana da comunidade, já o índice de Shannon leva em consideração a riqueza e a abundância bacteriana (diversidade) com base na uniformidade da comunidade. Para determinar se houve diferenças significativas entre as diversidades alfa entre os períodos de lactação foi realizado o teste de t de Student (ANOVA).

Diversidade beta das comunidades microbianas associadas a diferentes períodos de lactação foi calculada utilizando o pacote *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) em R e gerada a partir das métricas de dissimilaridades: Unifrac não ponderada (Lozupone & Knight, 2005) e Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Essas dissimilaridades foram então plotadas usando o método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A função *adonis* foi usada para calcular a análise de variância permutativa multivariada (PERMANOVA) e verificar a força e significância estatística os grupos avaliados, com o pacote *vegan* (Dixon, 2003).

Análise da expressão (abundância) diferencial foi realizada também no ambiente estatístico R (versão 2.11.0, <http://www.R-project.org>), usando o pacote bioconductor edgeR (versão 1.6.5) (Robinson et al., 2010), e foram considerados significativos se a taxa de descoberta falsa (FDR) fosse <0,05.

3. RESULTADOS

A contagem bacteriana total (CBT) apresentou valor médio de $3,5 \times 10^2$ UFC/mL; $1,7 \times 10^2$ UFC/mL e $8,3 \times 10^2$ UFC/mL para os três períodos de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente, e, apresentaram em acordo com os padrões exigidos na Instrução Normativa n. 37 (MAPA, 2000) que estabelece o máximo de 500.000 UFC/mL (5×10^5 UFC/mL) no leite de cabra cru.

A composição química do leite foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os períodos de lactação (Tabela 1) enquanto que a CCS não revelou diferença ($p > 0,05$) entre os períodos de lactação avaliados. Os teores de gordura e sólidos totais foram superiores no final da lactação, enquanto que os teores de lactose foram mais elevados no início da lactação. A proteína apresentou valor médio superior aos 100 dias de lactação (período intermediário da lactação).

Tabela 1. Valores médios da composição químico do leite e da Contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação.

Período de Lactação	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)	CCS (Log.cs/mL)
Inicial (50 dias)	1,99 ^c	2,84 ^b	4,01 ^a	9,94 ^b	5,34 ^a
Intermediário (100 dias)	2,75 ^b	3,05 ^a	3,88 ^b	10,44 ^b	5,37 ^a
Final (150 dias)	4,24 ^a	2,61 ^c	3,85 ^b	11,67 ^a	5,41 ^a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estaticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O sequenciamento dos *amplicons* da região V3-V5 do gene 16S rRNA gerou um total de 823.417 sequências R1 com número médio de 14.900 mil sequências por amostra. Após o filtro de qualidade padrão do QIIME, o número total de sequências válidas foi 823.292, representando 99,98% do total de sequências R1. As bactérias presentes no leite cru de cabra pertenciam predominantemente a três filos: Actinobacteria (27,68%), Firmicutes (26,27%) e Proteobacteria (25,40%). Os filos Bacteriodetes, Deinococcus-Thermus foram observados em proporções inferiores (1,48 e 0,99%, respectivamente). No entanto, as proporções de cada filo variaram ao longo da lactação (Figura 1).

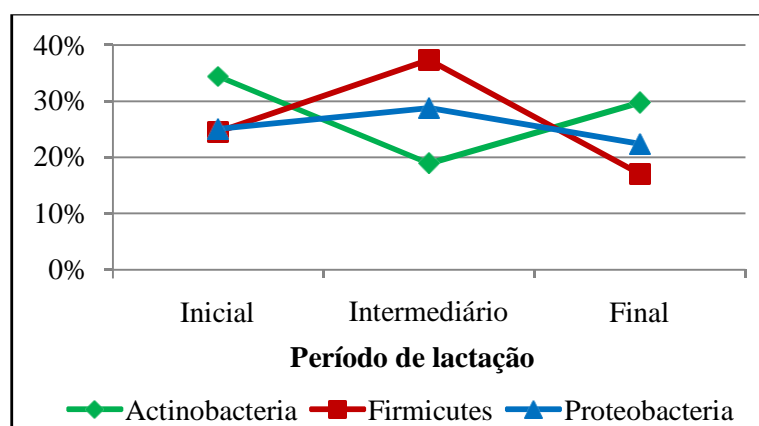


Figura 1. Dinâmica dos filos mais abundantes da comunidade bacteriana em amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.

O filo Actinobacteria apresentou maior abundância no período inicial (34,4%) e final da lactação (29,7%), revelando dinâmica antagônica ao filo Firmicutes, o qual apresentou menores proporções no início e fim da lactação (24,4% e 17%, respectivamente). O período intermediário de lactação foi dominado por bactérias dos filos Firmicutes (37,3%) e Proteobacteria (28,7%).

A Figura 2 apresenta a distribuição dos gêneros bacterianos mais abundantes encontrados em amostras de leite de cabra nos diferentes períodos de lactação. *Nocardioide*s foi o gênero dominante no início (27,6%) e final (24,2%) da lactação. Porém, aos 100 dias

de lactação apresentou menores proporções, sendo sobreposto pelos gêneros *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enhydrobacter*. Similarmente, houve redução do gênero *Propionibacterium* no período intermediário da lactação.

Staphylococcus e *Sphingomonas* apresentaram abundâncias inferiores até os 100 dias de lactação, mas, com aumento no final da lactação, apontando influência sobre o declínio do gênero *Brevibacillus* em mesmo estágio da lactação (final da lactação).

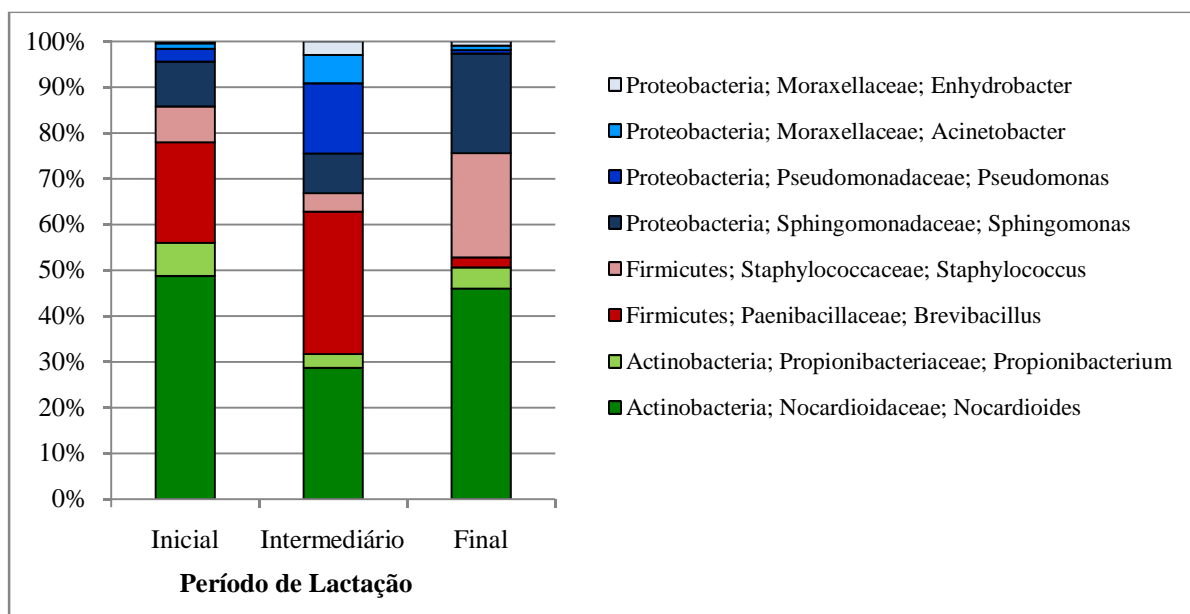


Figura 2. Composição bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.

Não houve diferença significativa na diversidade alfa nos diferentes períodos de lactação ($p > 0.05$) para os índices de Chao1 (Figura 3A) e Shannon (Figura 3B). Em contrapartida, pode-se observar que aos 100 dias de lactação (período intermediário de lactação) a riqueza da microbiota do leite foi superior aos demais períodos de lactação avaliados (Figura 3A). Porém, quando aplicado o índice de Shannon (Figura 3B) para comparar a diversidade alfa entre os diferentes períodos de lactação é possível verificar que há decréscimo de acordo com o avançar da lactação, assim, sendo o início da lactação (pico de lactação) com maior diversidade microbiana.

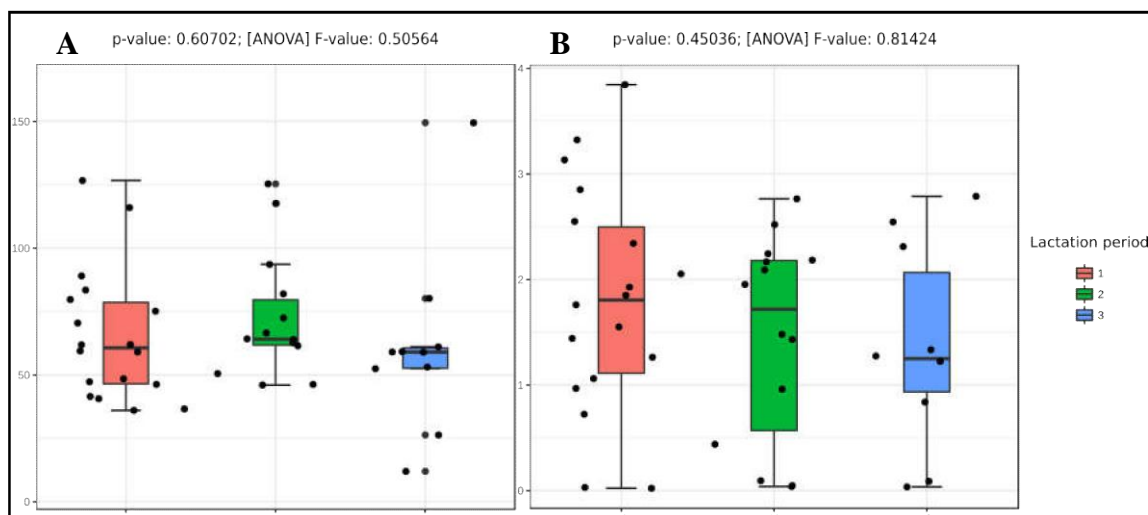


Figura 3. Diversidade alfa de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação. Boxplots baseados nos índices: A = Chao1 ($p=0,60$) e C = Shannon ($p=0,45$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente.

Na Figura 4 está apresentada a análise de diversidade beta através dos métodos PCoA, baseados nos índices Unifrac não-ponderada (Figura 4A) e Bray-Curtis (Figura 4B). De acordo com a análise PCoA, os eixos apresentados (PC1 e PC2) explicam 52,2% (Unifrac não-ponderada) e 53% (Bray-Curtis) da variância total da comunidade microbiana nos diferentes grupos avaliados. Em escala global, a microbiota das amostras de leite nos diferentes períodos de lactação avaliados se agrupam de maneira similar, e não apresentaram diferenças para os diferentes índices utilizados. Portanto, sugere-se que o período de lactação não definiu a dissimilaridade existente entre as amostras de leite.

A métrica Unifrac não-ponderada por levar em consideração a relação filogenética, revela apenas uma ($n=1$) amostra de leite do período de lactação final diferente das demais, já a métrica Bray-Curtis, que considera apenas abundância, revela três ($n=3$) amostras de leite aos 100 dias de lactação (período de lactação intermediário) que diferem das demais.

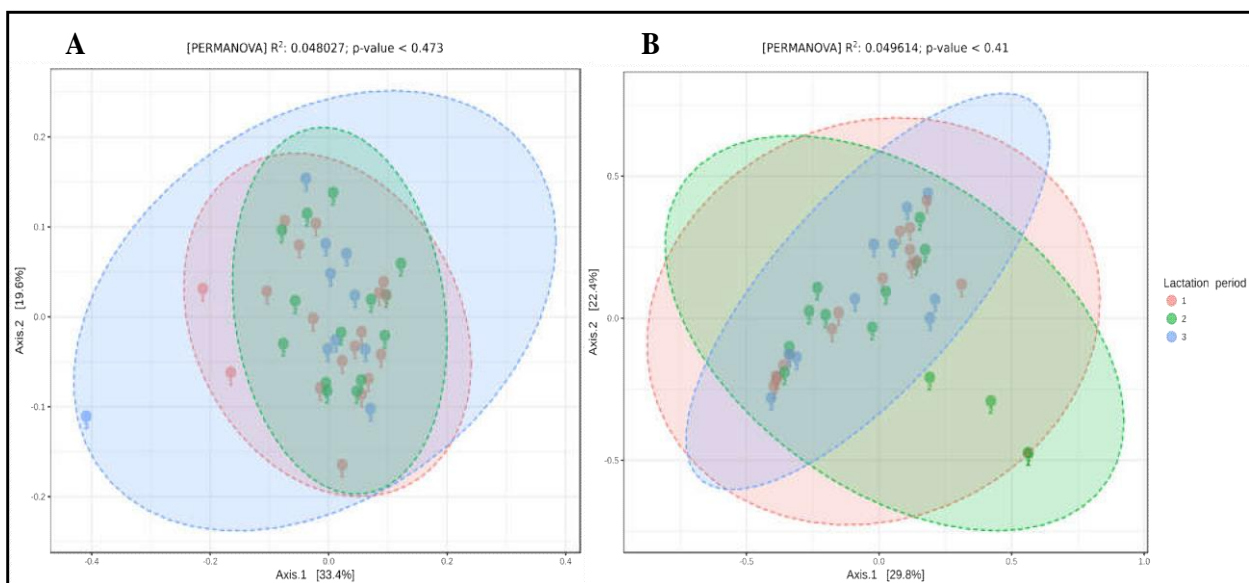


Figura 4. Diversidade beta de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação. PCoA baseados nos índices: A = Unifrac não-ponderada ($p < 0,473$) e B = Bray-Curtis ($p < 0,41$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $< 0,05$. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente.

Na Figura 5 foi ilustrada a análise de abundância diferencial das proporções de *taxa* bacterianos dominantes entre a microbiota de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação. Diferenças na abundância de *Pseudomonas* (FDR $< 0,05$) e *Acinetobacter* (FDR $< 0,0001$) ambos para o período de lactação intermediário, corroborando com descrição da taxonomia citada anteriormente.

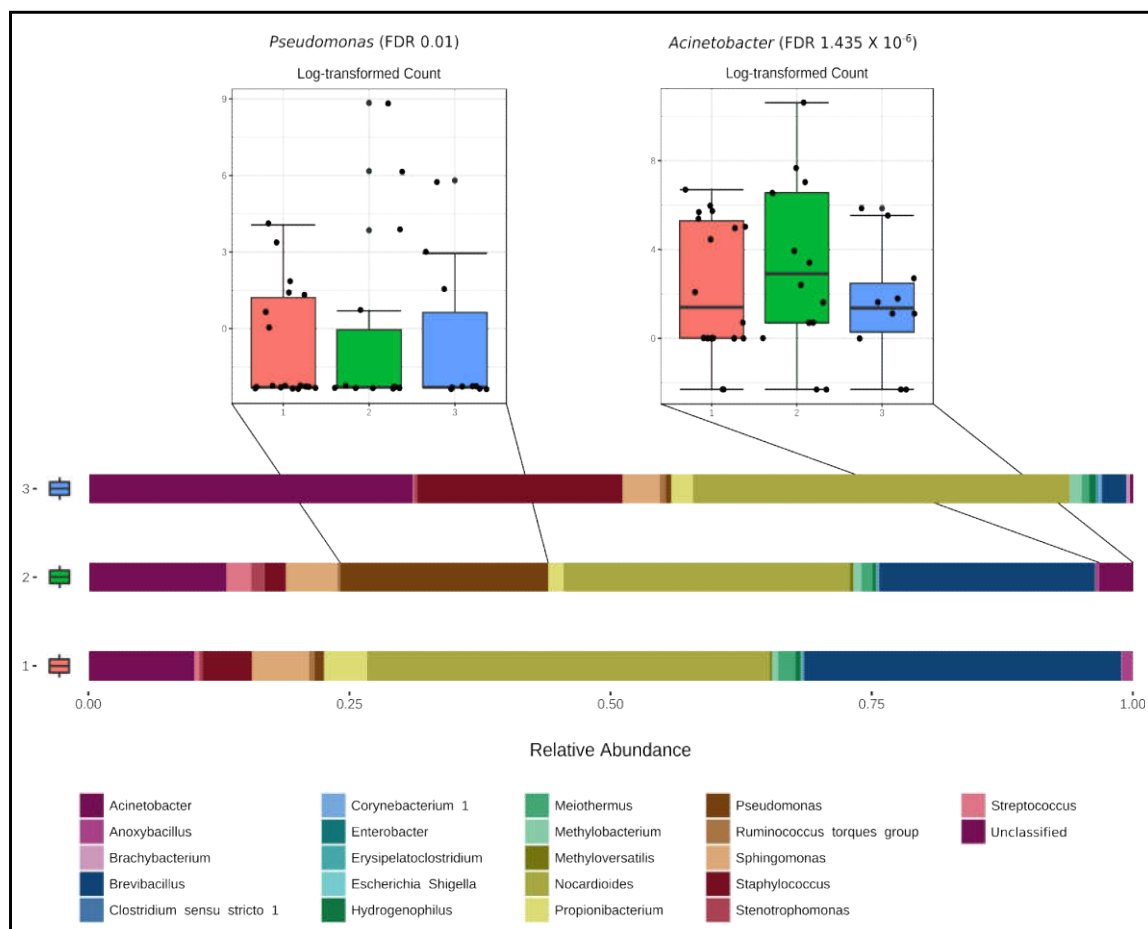


Figura 5. Análise da expressão diferencial da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Legenda: 1, 2 e 3 representam período de lactação inicial, intermediário e final, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos foram voltados à caracterização da microbiota do leite relacionada à mastite em ruminantes leiteiros utilizando técnicas moleculares inovadoras, como o sequenciamento de nova geração (Bhatt et al., 2012; Kuehn et al., 2013; Bhandari et al., 2014; Oikonomou et al., 2014; Zhang et al., 2015; Falentin et al., 2016). Com o sequenciamento de nova geração do gene 16S rRNA utilizado neste estudo pode-se visualizar uma imagem mais completa da comunidade bacteriana presentes no leite de cabra oriundos de glândulas saudáveis e sua dinâmica sobre o curso de uma lactação. Apesar de não ter havido diferenças significativas nas diversidades alfa e beta, foi possível observar que composição e estrutura da comunidade bacteriana do leite de cabra foram descritivamente diferentes entre os períodos de lactação avaliados, o que indica que o estágio da lactação do hospedeiro lactente desempenha papel importante na formação da composição da microbiota do leite.

Os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria apresentaram onipresença nos diferentes períodos de lactação, corroborando com alguns estudos recentes com leite de cabra (McInnis et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2017). *Nocardioide*s (filo Actinobacteria) foi o gênero bacteriano mais abundante, que inclui bactérias aeróbicas, não-fastidiosas e Gram-positivas encontradas no solo e na água, com ausência de relatos sobre seu isolamento no leite (Callon et al., 2007; Quigley et al., 2013). Contrariamente, estudos baseados em métodos dependentes de cultivo (Verdier-Metz et al., 2009; Quigley et al., 2011; Quigley et al., 2013) reportaram bactérias ácido-láticas (BAL) (pertencentes à família Lactobacillaceae do filo Firmicutes) como grupo de bactérias dominante no leite das mais variadas espécies de animais, inclusive caprinos. Neste estudo, este grupo constituiu apenas uma pequena parte do perfil bacteriano total do leite de cabra (0,30%).

A diversidade decrescente da microbiota do leite ao longo da lactação (índice de Shannon – Figura 3B) sugere ajuste com o declínio na produção de leite que ocorre necessariamente em uma lactação, além de abarcar exigências nutricionais diferentes em relação ao período lactacional. Em caprinos, ocorre aumento na produção de leite no início da lactação, alcançando pico de produção de leite aos 40-60 dias de lactação aproximadamente, e em seguida, uma depreciação no rendimento do leite à medida que atinge o final da lactação (Eknæs et al., 2006; Queiroga et al., 2007; Assan, 2014).

Em contrapartida, também sabido que a função primária e original para a produção de leite é atender fisiologicamente e nutricionalmente as necessidades da cria e neste sentido, autores têm relatado que a diversidade microbiana encontrada no leite advém da translocação de bactérias do trato gastrointestinal materno através da via entero-mamária bacteriana para as glândulas mamárias e depois para o leite a fim de garantir imunomodulação neonatal, incluindo a maturação inicial do sistema imunológico e gastrointestinal (Jost et al., 2014; Rodríguez et al., 2014; Young et al., 2015). Ainda, Cabrera-Rubio et al. (2016) relatam que a translocação bacteriana do intestino para o leite é promovida pelo estresse do trabalho de parto e o aumento da permeabilidade intestinal induzida pelo processo de expulsão fetal.

Ademais, a proporção elevada de Firmicutes (26,27%) no leite de cabra correlaciona-se com a composição do trato gastrointestinal de mamíferos, que é dominada por Firmicutes, (Ley et al., 2008), fortalecendo o transporte de bactérias intestinais para o leite através da via entero-mamária. De maneira particular, a dinâmica oposta dos filos Actinobacteria e Firmicutes influenciada pelo filo Proteobacteria no período intermediário da lactação, reflete a riqueza superior encontrada neste mesmo período de lactação (índice de Chao1 – Figura 3A). McInnis e colaboradores (2015) observaram dinâmica diferente em períodos de lactação de

cabras: Proteobacteria e Actinobacteria apresentaram proporções inversas ao longo da lactação e aumento proporcional de Firmicutes ao decorrer da lactação. A mudança ocorrida na microbiota do leite aos 100 dias de lactação pode ser atribuída ao aumento dos gêneros *Brevibacillus* (filo Firmicutes), *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Enhydrobacter* (ambos pertencentes ao filo Proteobacteria).

Pseudomonas e *Acinetobacter* foram mais abundantes no período de lactação intermediário (FDR <0.05 na análise de expressão diferencial) e corrobora para a redução do filo Actinobacteria. Alguns autores (Sørhaug et al., 1997; Quigley et al., 2013) relataram que populações psicotrópicas, como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., são gêneros bacterianos predominantes quando o leite cru é armazenado em baixas temperaturas. Descartada a possibilidade de o leite analisado ter sido armazenado em temperaturas baixas neste estudo, é possível que o teor de proteína significativamente superior neste período de lactação tenha influenciado esta expressão diferencial dos gêneros supracitados. Em associação a isto, é observado que o término do período chuvoso na região coincide com o período lactacional em questão e por consequência o reestabelecimento da diversidade vegetal da caatinga (bioma característico da região), assim, incrementando a dieta dos animais.

As cabras mantidas sob regime semi-intensivo envolvendo composição da vegetação heterogênea é um ponto a ser considerado, pois, em comparação a outros ruminantes como ovinos e bovinos, os hábitos alimentares e a capacidade dos caprinos em selecionar o alimento é proeminentemente, seja em condições de pastejo, seja em alimentação no cocho (Van Soest, 1994), visto a sua influência na quantidade e qualidade do alimento ingerido.

Descalzo et al. (2012) relataram que a composição lipídica e de compostos voláteis das plantas consumidas pelos animais, pode inferir na quantidade e qualidade destes componentes no leite e queijo de ruminantes, podendo ocorrer transferência direta de compostos voláteis das plantas para o leite, bem como modificar sua composição de ácidos graxos. *Enhydrobacter*, por sua vez, foi relatado em leite cru bovino e na produção de queijo como promotoras de deterioração envolvida na oxidação de lipídios e compostos voláteis (Callewaert et al., 2014; Bekker et al., 2016), ressaltando assim a influência da alimentação animal no período intermediário da lactação citada anteriormente, já que este gênero, também, apresentou abundância superior neste mesmo período de lactação.

Recentemente, Sant'Ana et al. (2017) estudando a influência do sistema de produção no semiárido brasileiro sobre o perfil de ácidos graxos voláteis e sensorial do leite e queijo caprino, concluíram em que o leite produzido por animais alimentados no sistema de produção extensivo/semi-intensivo realizado no bioma Caatinga contém composição de

ácidos graxos e compostos voláteis exclusivos, provenientes do metabolismo secundário das plantas consumidas.

Por outro lado, o gênero *Brevibacillus* apresentou abundância superior na comunidade bacteriana do leite aos 100 dias de lactação e, complementa a conversão da microbiota do leite neste período de lactação. Em estudo prévio, Zhang et al. (2017) avaliando a relação entre gêneros bacterianos, vias metabólicas e componentes do leite de cabra, descreveram o gênero *Brevibacillus* como um dos gêneros bacterianos relacionados ao metabolismo de aminoácidos, como aspartato, glutamato, histidina, leucina, metionina e treonina.

No último período de lactação avaliado, observamos que os gêneros *Sphingomonas* (do filo Proteobacteria) e *Staphylococcus* (do filo Firmicutes) com proporções de 11,46% e 12%, respectivamente, sobrepuseram *Brevibacillus*. Usualmente, *Staphylococcus* spp. é relatado entre os principais agentes etiológicos envolvidos na mastite clínica e subclínica em ruminantes leiteiros (Contreras et al., 2007; Peixoto et al., 2010; Keane et al., 2013; Silanikove et al., 2014; Patel et al., 2016; Acosta et al., 2016; Xing et al., 2016). Oikonomou et al. (2012) e Falentin et al. (2016), utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, citaram esse mesmo gênero incluído na microbiota do leite de vacas afetadas com mastite clínica e subclínica. Neste estudo, descartamos amostras de leite com cultivo positivo e mesmo assim, destacamos a presença de *Staphylococcus* entre os *taxa* mais abundantes, especialmente no final da lactação.

Adicionalmente, *Sphingomonas* foi reportado como as bactérias predominantes no leite de vacas que exibiam mastite clínica (Kuehn et al., 2013) e associado ao aumento da contagem de células somáticas no leite bovino, refletindo infecções intra-mamárias (Oikonomou et al., 2014). Interessantemente, no período de lactação em que este gênero (*Sphingomonas*) foi mais abundante, ou seja, final da lactação, é possível observar aumento da CCS nas amostras de leite avaliadas (5,41 Log.cu/mL), apesar dos valores de CCS não apresentarem diferença entre os períodos de lactação. Apesar do poder preditor de susceptibilidade à mastite que a CCS apresenta (Persson e Olofsson, 2011; Ferreira et al., 2013), em cabras leiteiras, de maneira especial, a presença de células somáticas dependem amplamente do estágio de lactação, paridade e entre outros fatores (Jimenez-Granado et al., 2014; Shah et al., 2017).

Posto que, este estudo apontou glândulas saudáveis como critério de seleção, é sugerido que o aumento de células somáticas esteja relacionado a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária que naturalmente ocorre no final da lactação mesmo na ausência de infecções intramamárias. Shah et al. (2017) reiteram que o conteúdo celular no

leite de cabra aumenta com a progressão da lactação. Ademais, o leite de cabra possui um número de partículas citoplasmáticas mais elevadas quando comparadas com outras espécies, pois apresentam secreção do tipo apócrina (Paape et al., 2001; Souza et al., 2012).

O período de lactação representa importante fator de variação nas características de composição do leite caprino. Neste estudo, o leite de cabra apresentou teores de gordura e sólidos totais significativamente superiores no início da lactação, já o teor de lactose apresentou maior valor no final da lactação ($p < 0.05$), corroborando com estudos anteriores (Haenlein, 2004; Costa, Queiroga e Pereira, 2009; Mendes et al., 2009; Abbas et al., 2014; Antunović et al., 2016). Estas alterações na composição do leite podem ser explicadas pelo efeito de diluição, visto que, ocorre uma redução gradual da produção de leite com o avanço do período de lactação em cabras, aumentando assim, a concentração de sólidos na fase final da lactação, principalmente nos teores de gordura. Curiosamente, Boerhout et al. (2016) analisaram a associação entre a parâmetros de composição do leite no momento da inoculação bacteriana experimental de *Staphylococcus aureus* em glândulas mamárias de vacas leiteiras, e observaram associação positiva entre a porcentagem de gordura do leite e o número de *S. aureus* reisolado a partir do leite inoculado.

A associação relatada pelos autores supracitados pode explicar o aumento na abundância do gênero *Staphylococcus* aos 150 dias de lactação neste estudo, posto que a concentração de gordura foi mais elevada nesta fase final da lactação. Para tal fenômeno, os autores baseiam-se na teoria descrita por Reinitz et al. (1982), ao relatarem que a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos é inibida pela presença de glóbulos de gordura do leite: ao encontrar glóbulos gordurosos dentro da glândula mamária, os fagócitos começam a ingerir esses glóbulos, como resultado, a capacidade da célula para diminuir o pH dos fagossomos é prejudicada, afetando a digestão por enzimas lisossômicas e reduzindo assim a capacidade fagocítica do fagócito. Além disso, Lee et al. (2014) reforçam que altas concentrações de gordura no leite podem beneficiar a proliferação de *Staphylococcus*, em razão da capacidade de formar biofilme que bactérias deste gênero (em especial *S. aureus*) carregam ao se ligarem aos glóbulos de gordura do leite.

A abundância de *Propionibacterium* foi ligeiramente constante ao longo da lactação dos animais avaliados. Estudos recentes relataram a presença deste gênero em glândulas mamárias híginas de ruminantes (Oikonomou et al., 2014; Rezende, 2016; Li et al., 2017) e de humanos (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Jiménez et al., 2015). *Propionibacterium* spp. isolados de ambientes lácteos relatados por Cousin et al. (2011) foram relacionados com a

lipólise de ácidos de cadeia ramificada após o catabolismo de aminoácidos desempenhando assim papéis promotores de saúde.

A partir de uma perspectiva de ecologia microbiana, Ma et al. (2015) sugeriram que patógenos potencialmente oportunistas são inibidos por uma rede cooperativa de comunidades bacterianas em leite humano. Assim, é provável que a taxonomia do leite revelada neste estudo, de fato seja importante na manutenção da ecologia do leite e saúde das cabras investigadas.

De maneira complementar, é sugerido que além do período de lactação, outros fatores como genética, ambiente, dieta, etc. possam influenciar a composição específica temporal da microbiota do leite e, portanto, determinar e compreender as efetivas interações entre todos esses fatores continua sendo um desafio científico.

5. CONCLUSÃO

A microbiota do leite de cabra varia em função do período de lactação, e expressivamente diferente em torno de 100 dias de lactação, pelos gêneros bacterianos *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. As alterações que ocorrem na comunidade microbiana do leite caprino a partir de cabras sem infecção intramamária presumem a existência de imunomodulação neonatal e da glândula mamária a fim de garantir a manutenção da ecologia do leite e promoção da saúde animal.

6. REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. H.; HASSAN, F.; A. M. ABD EL- GAWAD, M.; *et al.* Physicochemical Characteristics of Goat's Milk. **Life Science Journal**, v. 11, p. 307–317, 2014.
- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; *et al.* Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- ALVES, T. L. B.; AZEVEDO, P. V.; FARIAS, A. A. Comportamento da Precipitação Pluvial e sua Relação com o Relevo nas Microrregiões do Cariri Oriental e Ocidental do Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, n. 6, p. 1601–1614, 2015.
- ANTUNOVIĆ, Z.; MARIĆ, I.; LONČARIĆ, Z.; *et al.* Changes in macroelements, trace elements, heavy metal concentrations and chemical composition in milk of Croatian spotted goats during different lactation stages. **International Journal of Dairy Technology**, 2018.
- APHA (American Public Health Association). Committee on Microbiological Methods for Foods: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, DC., 1992.

- ASSAN, N. Influence of stage of lactation on quantitative and qualitative milk production parameters in goats. **Scientific Journal of Animal Science**, v. 3, n. 12, p. 291–300, 2014.
- BEKKER, A.; JOOSTE, P.; STEYN, L.; *et al.* Lipid breakdown and sensory analysis of milk inoculated with *Chryseobacterium joostei* or *Pseudomonas fluorescens*. **International Dairy Journal**, v. 52, p. 101–106, 2016.
- BHANDERI, B. B.; JHALA, M. K.; AHIR, V. B.; *et al.* Cultural and metagenomic based identification of a microbiome from subclinical mastitis in cows. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 3, p. 215–228, 2014.
- BHATT, V. D.; AHIR, V. B.; KORINGA, P. G.; *et al.* Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 639–650, 2012.
- BOERHOUT, E. M.; KOETS, A. P.; VERNOOIJ, J. C. M.; *et al.* Reisolation of *Staphylococcus aureus* from bovine milk following experimental inoculation is influenced by fat percentage and specific immunoglobulin G1 titer in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4259–4269, 2016.
- BORBUREMA, J. B.; SOUZA, B. B.; CEZAR, M. F.; *et al.* Influência de fatores ambientais sobre a produção e composição físico-química do leite. **Agropecuária Científica no semiárido**, v. 9, n. 4, p. 15–19, 2013.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1957.
- BROUCEK, J.; MIHINA, S.; UHRINCAT, M.; *et al.* Impact of Gestation and Lactation Stage on the Dairy Cow Response Following Removal to Unfamiliar Housing and Milking System. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 2, p. 3410, 2015.
- CABRERA-RUBIO, R.; COLLADO, M. C.; LAITINEN, K.; *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544–551, 2012.
- CALLEWAERT, C.; MAESENEIRE, E.; KERCKHOF, F.; *et al.* Microbial Odor Profile of Polyester and Cotton Clothes after a Fitness Session. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 21, p. 6611–6619, 2014.
- CALLON, C.; DUTHOIT, F.; DELBÈS, C.; *et al.* Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547–560, 2007.
- CHAO, A.. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.
- CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; *et al.* Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 145–153, 2007.
- COSTA, R. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; PEREIRA, R. A. G. Influence of feed on the production on quality of goat milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SPE, p. 307–321, 2009.
- COUSIN, F. J.; MATER, D. D. G.; FOLIGNÉ, B.; *et al.* Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 1, p. 1–26, 2011.
- DESCALZO, A. M.; L.ROSSETTI; PÁEZ, R.; *et al.* Differential Characteristics of Milk Produced in Grazing Systems and Their Impact on Dairy Products. **Milk Production - Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health**, 2012.

DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 2003.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

EKNÆS, M.; KOLSTAD, K.; VOLDEN, H.; *et al.* Changes in body reserves and milk quality throughout lactation in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 2006.

FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; *et al.* Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>. Acesso em: 08 jan. 2018.

FERNÁNDEZ, L.; LANGA, S.; MARTÍN, V.; *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 1–10, 2013.

FERREIRA, A. M.; BISLEV, S. L.; BENDIXEN, E.; *et al.* The mammary gland in domestic ruminants: a systems biology perspective. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 110–123, 2013.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, n. 2, p. 155–163, 2004. (Contribution of Goats to Mankind).

HETTINGA, K.; VALENBERG, H.; VRIES, S.; *et al.* The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19433, 2011.

HOOD, L. Tackling the Microbiome. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1209–1209, 2012.

HUNT, K. M.; FOSTER, J. A.; FORNEY, L. J.; *et al.* Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21313, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=PPM01&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

JIMÉNEZ-GRANADO, R.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.; ARCE, C.; *et al.* Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 133–150, 2014.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C. P.; *et al.* Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891–2904, 2014.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.; *et al.* Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. **The British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 7, p. 1253–1262, 2013.

KEANE, O. M.; BUDD, K. E.; FLYNN, J.; *et al.* Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. **The Veterinary Record**, v. 173, n. 1, p. 17, 2013.

KUEHN, J. S.; GORDEN, P. J.; MUNRO, D.; *et al.* Bacterial Community Profiling of Milk Samples as a Means to Understand Culture-Negative Bovine Clinical Mastitis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61959, 2013.

LEE, S. H. I.; MANGOLIN, B. L. C.; GONÇALVES, J. L.; *et al.* Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1812–1816, 2014.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5883, p. 1647–1651, 2008.

LI, Z.; WRIGHT, A. G.; YANG, Y.; *et al.* Unique Bacteria Community Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40950, 2017.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R.. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MA, Z.; GUAN, Q.; YE, C.; *et al.* Network analysis suggests a potentially “evil” alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8275, 2015.

MCINNIS, E. A.; KALANETRA, K. M.; MILLS, D. A.; *et al.* Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. **Food Microbiology**, v. 46, p. 121–131, 2015.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S.. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. CARACTERIZAÇÃO ORGANOLÉPTICA, FÍSICO-QUÍMICA, E MICROBIOLÓGICA DO LEITE DE CABRA: UMA REVISÃO. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 1, p. 5–12, 2009.

NASCIMENTO, S. S.; ALVES, J. J. A. Ecoclimatologia do Cariri Paraibano. **Revista geográfica academica**, v. 2, n. 3, p. 28–41, 2008.

NMC - National Mastitis Council. Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infections and determination of milk quality (4^a Ed.). Verona: NMC, p. 47, 2004.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA, E.; *et al.* Microbiota of Cow’s Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.

OIKONOMOU, G.; MACHADO, V. S.; SANTISTEBAN, C.; *et al.* Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16s rDNA. **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47671, 2012.

OLIVER, S.P.; BOOR, K. J.; MURPHY, S. C.; *et al.* Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, 2009.

PAAPE, M. J.; POUTREL, Bernard; CONTRERAS, Antonio; *et al.* Milk Somatic Cells and Lactation in Small Ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E237–E244, 2001.

PATEL, S. H.; VAIDYA, Y. H.; JOSHI, C. G.; *et al.* Culture-dependent assessment of bacterial diversity from human milk with lactational mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 437–443, 2016.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010.

PERSSON, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 15, 2011.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal Infection Disease**, v.7, p.632-640, 1910. (*Milk - M-I-05-3: 2400g DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT*. National Conference on Interstate Milk Shipments. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm075202.html>>

PYLRO, V. S.; MORAIS, D. K.; DE OLIVEIRA, F. S.; *et al.* BMPOS: a Flexible and User-Friendly Tool Sets for Microbiome Studies. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 2, p. 443–447, 2016.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; ORTEGA, J. M.; *et al.* Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B.; *et al.* Effects of flock management, milking sanitary conditions and lactation stage on milk composition of Saanen goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430–437, 2007.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; *et al.* Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2–3, p. 81–94, 2011.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; STANTON, C.; *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.

REINITZ, D. M.; PAAPE, M. J.; MATHER, I. H. Effect of Phagocytosed Fat and Casein on the Intraphagosomal pH in Bovine Polymorphonuclear Leukocytes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 170, n. 3, p. 281–285, 1982.

REZENDE, Lilian Ribeiro. **Caracterização molecular da comunidade bacteriana em rebanhos leiteiros com mastite subclínica**. text, Universidade de São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-10082016-130206/>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

RODRÍGUEZ, J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 6, p. 779–784, 2014.

ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.

SANT’ANA, A. M. S.; RIBEIRO, J. E. S.; BEZERRIL, F. F.; *et al.* Volatile compound characterization of caprine milk by multivariate optimization of headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME). **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, 2017.

SHAH, A.; DARZI, M. M.; KAMIL, S. A.; *et al.* Somatic cell alteration in healthy and mastitic milk of sheep and goats. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 6, p. 27–33, 2017.

SHANNON, C. E., WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, p.29, 1949.

SILANIKOVE, N.; MERIN, U.; LEITNER, G. On effects of subclinical mastitis and stage of lactation on milk quality in goats. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1–3, p. 76–82, 2014.

- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35–41, 1997.
- SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; *et al.* Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2–3, p. 65–75, 2012.
- SOUZA, L. L. *et al.* A Importância das Ômicas como Ferramentas para o Estudo da Prospecção de Microrganismos: Perspectivas e Desafios. **Uningá**, v. 18, n. 2, p. 16-21, 2014.
- URBANIAK, C.; ANGELINI, M.; GLOOR, G. B.; *et al.* Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, p. 1, 2016.
- VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. Ithaca: Comstock, 1994. 476p.
- VERDIER-METZ, I.; GAGNE, G.; BORNES, S.; *et al.* Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 326–333, 2012.
- WICKHAM, H. ggplot2. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180–185, 2011.
- XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**, v. 59, p. 644–650, 2016.
- YOUNG, W.; HINE, B. C.; WALLACE, O. A. M.; *et al.* Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, p. e888, 2015.
- ZHANG, F.; WANG, Z.; LEI, F.; *et al.* Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 2017.
- ZHANG, R.; HUO, W.; ZHU, W.; *et al.* Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 1072–1079, 2015.

CAPÍTULO III

Artigo científico:

**Diversidade bacteriana do leite de cabra em diferentes microrregiões do Estado da
Paraíba, Brasil**

DIVERSIDADE BACTERIANA DO LEITE DE CABRA EM DIFERENTES MICRORREGIÕES DO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo caracterizar comparativamente a microbiota do leite de cabras sem infecção intramamária criadas em duas microrregiões do estado da Paraíba: Cariri e Brejo, utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA. Para tanto, em uma propriedade na região do Cariri Paraibano, o leite foi coletado a partir de vinte e duas cabras leiteiras mestiças e multíparas; e também coletado em uma propriedade na região do Brejo Paraibano a partir de oito cabras leiteiras mestiças e multíparas. Lactocultura e contagem bacteriana total (CBT) foram realizadas a fim selecionar apenas amostras de leite oriundas de glândulas mamárias sem infecção intramamária (ausência de mastite clínica e subclínica). A composição química (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) e a contagem de células somáticas (CCS) e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Após a extração de DNA foi feita a amplificação das regiões V3-V5 do gene 16S rRNA foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* gerados. A diversidade alfa foi estimada pelos índices de Chao1 e Shannon e submetida à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade); e a diversidade beta foi estimada pelas métricas Unifrac não-ponderada e Bray-Curtis e submetidas à análise de variância permutativa multivariada (PERMANOVA). Análise de abundância diferencial foi realizada no pacote edgeR com taxa de descoberta falsa (FDR) (5% de probabilidade). Cinquenta e três (53/60) amostras de leite apresentaram ausência de infecção intramamária e foram encaminhadas ao sequenciamento de DNA, sendo 42 e 11 amostras de leite, respectivamente, para a região Cariri e Brejo. A composição química do leite e CCS foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre as regiões avaliadas, e todos os componentes exceto proteína apresentaram valores médios significativamente maiores na região do Cariri. As bactérias presentes no leite cru de cabra pertenciam predominantemente a três principais filos: Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria e a diversidade alfa apresentou significativamente superior ($p < 0,05$) no leite de cabra coletado na região Brejo. Os gêneros *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* e *Methylobacterium* foram mais abundantes no leite produzido no Cariri, enquanto que os gêneros *Nocardioideis*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Anoxybacillus*, *Acinetobacter* e *Escherichia-Shigella* foram mais abundantes no leite produzido no Brejo. A riqueza inferior do leite coletado na região Cariri, possivelmente esteja associado à maior abundância do gênero *Bacillus*, relatado por promover interação negativa com diversos gêneros. Contudo, os gêneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Anoxybacillus* e *Escherichia-Shigella* apresentaram abundância diferencial para as regiões avaliadas (FDR < 0.05 na análise de expressão diferencial). As diferenças encontradas na comunidade microbiana do leite caprino, neste estudo, podem estar associadas aos fatores geográficos peculiares de cada região, a fim de garantir “adaptações funcionais” específicas.

Palavras-chave: semiárido do nordeste, leite cru, microbiota, gene 16SrRNA

BACTERIAL DIVERSITY OF GOAT MILK IN DIFFERENT MICROREGIONS OF THE STATE OF PARAÍBA, BRAZIL

ABSTRACT: The objective of the present study was to characterize the microbiota of goat milk without intramammary infection created in two micro regions of the state of Paraíba: Cariri and Brejo using the 16S rRNA gene sequencing. For this purpose, in a property in the region of Cariri Paraibano, milk was collected from twenty-two mongrel and multiparous dairy goats; and also collected in a property in the region of Brejo Paraibano from eight crossbred and multiparous dairy goats. Lactoculture and total bacterial counts (TBC) were performed in order to select only milk samples from mammary glands without intramammary infection (absence of clinical and subclinical mastitis). The chemical composition (fat, protein, lactose and total solids) and somatic cell counts (SCC) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means comparison was done by the Tukey test at the 5% probability level. After the DNA extraction was done the amplification of the V3-V5 regions of the 16S rRNA gene was performed the sequencing of the amplicons generated. The alpha diversity was estimated by Chao1 and Shannon indices and submitted to analysis of variance and means comparison by Tukey's test (5% probability); and the beta diversity was estimated by the non-weighted Unifrac and Bray-Curtis metrics and subjected to multivariate analysis of permutative variance (PERMANOVA). Differential abundance analysis was performed on the edgeR package with false detection rate (FDR) (5% probability). Fifty-three (53/60) milk samples showed no intramammary infection and were sent to DNA sequencing, being 42 and 11 milk samples, respectively, for the Cariri and Brejo regions. The chemical composition of milk and SCC were significantly different ($p < 0.05$) between the evaluated regions, and all components except protein showed significantly higher mean values in the Cariri region. Bacteria present in raw goat milk belonged predominantly to three main phyla: Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria and alpha diversity showed significantly higher ($p < 0.05$) in goat milk collected in the Brejo region. The genera *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* and *Methylobacterium* were more abundant in the milk produced in the Cariri, whereas the genera *Nocardioides*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Anoxybacillus*, *Acinetobacter* and *Escherichia-Shigella* were more abundant in the milk produced in Brejo. The lower richness of the milk collected in the Cariri region is possibly associated with the greater abundance of the genus *Bacillus*, reported for promoting negative interaction with several genera. However, the genera *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Anoxybacillus* and *Escherichia-Shigella* presented differential abundance for the regions evaluated (FDR < 0.05 in the differential expression analysis). The differences found in the goat milk microbial community in this study may be associated with the particular geographic factors of each region, in order to guarantee specific "functional adaptations".

Keywords: northeastern semi-arid, raw milk, microbiota, 16SrRNA gene

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do leite está associada ao seu valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, reduzida contagem de células somáticas e baixa carga bacteriana (Quigley et al., 2011). Particularmente, a carga bacteriana elevada do leite cru favorece negativamente a composição físico-química, além de representar potencial risco à saúde animal e humana.

A composição da microbiota do leite cru tem sido tradicionalmente estudada através de técnicas microbiológicas convencionais visando fenótipos específicos, geralmente bactérias indicadoras de qualidade e/ou grupos potencialmente patogênicos ao consumidor (Doyle et al., 2017). No entanto, os avanços recentes na microbiologia molecular e, sobretudo quando baseados no sequenciamento de DNA em larga escala, têm permitido análises mais aprofundadas da comunidade bacteriana em diferentes ambientes, revelando microrganismos não cultiváveis através de métodos de cultivo convencionais. Tais avanços têm superado as limitações dos métodos microbiológicos dependentes de cultivo nas investigações sobre ecologia microbiana (Souza et al., 2014; Addis et al., 2016).

Estudos recentes com leite humano e de ruminantes leiteiros, utilizando sequenciamento de DNA, demonstram que diversos fatores podem influenciar a composição da microbiota do leite, como a presença de infecção intramamária (Oikonomou et al., 2014; Falentin et al., 2016; Patel et al., 2016), estágio de lactação (Cabrera-Rubio et al., 2012; Khodayar-Pardo et al., 2014; McInnis et al., 2015), práticas de manejo (Aust et al., 2013; Zhang et al., 2015; Kable et al., 2016; Pereira et al., 2016; Urbaniak et al., 2016), genética (Bhatt et al., 2012), dentre outros. No entanto, a diversidade microbiana do leite é pouco explorada comparativamente entre regiões geográficas envolvendo clima, alimentação e manejo distintos. Boix-Amorós et al. (2016) reportaram que fatores geográficos poderiam influenciar na diversidade microbiana do leite materno, posto que observaram que gêneros bacterianos em amostras de leite humano de mães espanholas diferiam dos gêneros bacterianos encontrados em amostras de leite humano de mães americanas e/ou finlandesas.

O estado da Paraíba detém uma produção de leite de cabra superior a 14 mil litros de leite de cabra (IBGE, 2017), sendo parcela expressiva para a capricocultura leiteira na região Nordeste e nacional, e caracteriza-se como atividade pecuária em evolução. Tal produção concentra-se principalmente nas regiões semiáridas, em especial na microrregião denominada Cariri, entretanto, a Paraíba está dividida em outras microrregiões geográficas com particularidades climáticas que podem afetar as condições alimentares e conforto térmico dos animais.

Na microrregião do Cariri, o índice pluviométrico é baixo e a vegetação dominante é a Caatinga, sendo uma microrregião sujeita ao processo de desertificação. De maneira inversa, a microrregião denominada Brejo é caracterizada por ser uma área que apresenta um maior índice pluviométrico, quando comparado com as demais microrregiões que compõem o estado da Paraíba, propiciando o cultivo de várias espécies vegetais de ciclo curtos e perenes (Costa et al., 2015).

Assim sendo, o presente estudo objetivou caracterizar comparativamente a microbiota do leite de cabras sem infecção intramamária criadas em duas microrregiões distintas do estado da Paraíba: Cariri e Brejo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de estudo e amostragem

Foram coletadas 60 amostras de leite provenientes de 30 cabras leiteiras mestiças e multíparas em duas propriedades localizadas em diferentes regiões do semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil:

(a) no município de Gurjão (n=44), localizado na microrregião Cariri Oriental entre as coordenadas 07°14'48" (S) e 36°29'22" (W) e, clima tipo semi-árido quente (BSh);

(b) no município de Bananeiras (n=16), localizado na microrregião Brejo entre as coordenadas 06°45'00" (S) e 35°38'00" (W) e clima tipo tropical quente-úmido (As).

Em ambas as propriedades, os animais estavam com 80 dias de lactação (após o pico da lactação) e eram criados em sistema semi-extensivo e submetidas à ordenha manual matutina. A propriedade localizada no município de Gurjão não possuía sala de ordenha, sendo os animais ordenhados próximo ao curral, em um lugar improvisado, ao contrário da propriedade localizada no município de Bananeiras que possuía sala de ordenha, com paredes e os pisos revestidas por cerâmicas.

Na propriedade da região Cariri, os animais eram alimentados a pasto em campo nativo (bioma caatinga) com suplementação volumosa (palma picada) ou concentrada (a base de farelo de soja, farelo de milho e farelo de trigo). Na propriedade da região Brejo, os animais eram alimentados com volumoso à vontade (capim-elefante - *Pennisetum purpureum* Schum. cv. *Napier* - como capineira, sob a forma verde picado) e ração concentrada (milho triturado, farelo de soja, farelo de algodão, farelo de trigo), com volume e composição variando de acordo com a disponibilidade, sem considerar os critérios nutricionais.

Antes da coleta de amostras de leite, seguindo as recomendações do *National Mastitis Council* (NMC, 2004), as tetas dos animais foram lavadas com água clorada e posteriormente limpas com álcool etílico 70%, os primeiros jatos de leite foram descartados e assim aproximadamente 50 mL de leite de cada glândula mamária foram coletados em tubos estéreis, refrigeradas e encaminhadas para o laboratório para análises posteriores.

Com o objetivo de proporcionar boa qualidade de ajuste ao modelo de predição calculado, optou-se por incluir neste estudo apenas amostras de leite oriundas de glândulas saudáveis, de acordo com os seguintes requisitos: (a) animais sem sinais de doença clínica; (b) ausência de mastite clínica (exames de palpação e inspeção para detecção de sinais clínicos visíveis); (c) lactocultura negativa (diagnóstico padrão-ouro para mastite subclínica), sendo considerado lactocultura positiva quando houve o crescimento de três ou mais colônias não hemolíticas, ou apenas uma colônia hemolítica.

2.2. Análises laboratoriais

Lactocultura

A lactocultura das amostras de leite foi realizada por semeadura do mesmo em ágar sangue de carneiro à 5% desfibrinado e incubadas a 37 °C em aerobiose, realizando observações de crescimento bacteriano após 24, 48 e 72 horas. Com base nas características morfológicas e tintórias, e presença de atividade hemolítica, as bactérias foram identificadas e isoladas em ágar tripton de soja (TSA) e submetidas à verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram, teste da catalase e coagulase em tubo (NMC, 2004).

Contagem bacteriana total (CBT) e Contagem de células somáticas (CCS)

A contagem bacteriana total de bactérias aeróbias mesófilas (CBT) foi realizada segundo recomendações da American Public Health Association (APHA, 1992). As amostras foram diluídas seriadamente em água peptonada (0,1%) e alíquotas (1 mL) foram semeadas em ágar padrão para contagem (PCA), incubadas a 37 °C por 48 horas. O número total de microrganismos foi expresso em UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro). A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada por microscopia direta segundo a metodologia descrita por Prescott e Breed (1910), tendo como suporte o guia proposto pela National Conference on Interstate Milk Shipments (2005).

Composição química

As determinações dos teores de proteína, gordura, lactose e sólidos totais foram realizadas por absorção infravermelha utilizando-se o equipamento Bentley 2000 (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995). As amostras de leite destinadas a essa análise continham o conservante bronopol a 4%.

Análise dos dados

As análises de variâncias para composição química do leite e CCS foram feitas pelo programa de análises estatísticas SISVAR 5.6 (Ferreita, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de CCS foram logaritmicamente (log10) transformados.

2.3. Análises moleculares

Extração de DNA

O protocolo de extração foi realizado pelo kit comercial Powersoil™ DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, a partir amostras de leite previamente tratadas com lisozima e proteinase K para maximização da lise da parede celular microbiana. Inicialmente, as amostras de leite (15 mL) foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min, descartou-se o sobrenadante e ao precipitado obtido foi adicionado 1 mL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA). Dessa mistura retirou-se 500 µL e transferiu-se para microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (5 mg/mL), homogeneizou-se a solução em vórtex e esta foi incubada em banho-maria a 55 °C/2h. Em seguida, transferiu-se todo o conteúdo para tudo *PowerBead* (fornecido pelo kit) e prosseguiu-se os passos do kit comercial.

O DNA extraído foi avaliado quali-quantitativamente por espectrofotometria de micro volume em aparelho Colibri (Titertek-Berthold, Germany) e sua integridade avaliada visualmente em gel de agarose (1%). As amostras de DNA foram então estocadas em kit de armazenamento GenTegra (cat. nº GTD0001, Pleasanton, CA, EUA) segundo instruções do fabricante com posterior secagem em dessecador acoplado em bomba de vácuo durante 5 horas, e enviadas para sequenciamento.

Sequenciamento do gene 16S rRNA e bioinformática

Cinquenta e três (n=53) amostras de leite analisadas estavam em acordo com os requisitos de seleção para este estudo, a fim de avaliar amostras de leite oriundas de glândulas mamárias híginas (ausência de mastite clínica e subclínica). Destas, quarenta e duas (n=42) amostras de leite pertenciam ao município localizado região do Cariri Paraibano e onze (n=11) amostras de leite pertenciam ao município localizado na região do Brejo Paraibano.

O sequenciamento foi realizado na Unidade de Sequenciamento de Larga Escala (*High-Through put Sequencing and Genotyping Unit*) do Centro de Biotecnologia Roy J. Carver da UIUC (Urbana, EUA). A amplificação das regiões V3-V5 do gene 16S rRNA foi realizada utilizando-se os iniciadores V3 F357 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG) e V5 R926 (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT), com o auxílio do sistema *IFC Access array* (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA). A reação de amplificação foi realizada no sistema *FCI Cycler* (Fluidigm, South San Francisco, CA, EUA).

As bibliotecas foram purificadas com kit comercial AMPure XP beads (Illumina, San Diego, CA, EUA), quantificadas por qPCR e sua qualidade avaliada com o kit High density DNA Assay no equipamento FragmentAnalyzer (AdvancedAnalytical Technologies Inc, Ankeny, Iowa, USA). O DNA de PhiX foi adicionado nas amostras como controle para as corridas MiSeq (kit PhiX, Illumina), na concentração mínima de 5%. O sequenciamento foi realizado em única flowcell de MiSeq para 301 ciclos de cada extremidade dos fragmentos, utilizando-se kit de sequenciamento de 600 ciclos para MiSeq V3 (Illumina), de acordo com recomendações do fabricante. As sequências produzidas apresentaram 300 pb de comprimento.

Os dados brutos foram processados conforme recomendação do *Brazilian Microbiome Project* (Pylro et al., 2014), com algumas atualizações que incluem a substituição o uso do programa USEARCH (Edgar, 2010) pelo VSEARCH (Rognes et al., 2016) (disponível em: <http://www.brmicrobiome.org/16sillumina>), através do Sistema Operacional BMP (Pylro et al., 2016). O agrupamento de sequências com 97% de corte de similaridade, e em seguida, as sequências foram alinhadas contra o banco de dados de referência SILVA (Quast et al., 2013) (versão 132).

Análise dos dados

A visualização dos dados foi realizada exclusivamente em R e as análises estatísticas foram realizadas usando uma combinação de scripts QIIME e R (R Core Team, 2016). Para

análise feita em R, as tabelas de OTUs rarefeitas foram convertidas para o formato json e exportadas para análise de diversidade e expressão diferencial.

Diversidade alfa foi calculada utilizando o pacote *ggplot2* (Wickham, 2011), e gerada pelas métricas de diversidade: Chao1 (Chao, 1984) e Shannon (Shannon & Weaver, 1949). O índice de Chao1 considera apenas a riqueza bacteriana da comunidade, já o índice de Shannon leva em consideração a riqueza e a abundância bacteriana (diversidade) com base na uniformidade da comunidade. Para determinar se houve diferenças significativas entre as diversidades alfa entre os períodos de lactação foi realizado o teste de t de Student (ANOVA).

Diversidade beta das comunidades microbianas associadas a diferentes períodos de lactação foi calculada utilizando o pacote *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) em R e gerada a partir da métrica de dissimilaridades Unifrac não ponderada (Lozupone & Knight, 2005). Essa dissimilaridade foi então plotada usando o método de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). A função *adonis* foi usada para calcular a análise de variância permutativa multivariada (PERMANOVA) e verificar a força e significância estatística os grupos avaliados, com o pacote *vegan* (Dixon, 2003).

Análise da expressão (abundância) diferencial foi realizada também no ambiente estatístico R (versão 2.11.0, <http://www.R-project.org>), usando o pacote bioconductor edgeR (versão 1.6.5) (Robinson et al. 2010), e foram considerados significativos se a taxa de descoberta falsa (FDR) fosse <0,05.

3. RESULTADOS

A contagem bacteriana total (CBT) apresentou valores médios de $3,6 \times 10^2$ UFC/mL e $1,8 \times 10^2$ UFC/mL para as regiões do Cariri e Brejo, respectivamente, e, dentro dos padrões exigidos na Instrução Normativa n. 37 (MAPA, 2000) que estabelece o limite máximo de 500.000 UFC/mL (5×10^5 UFC/mL) no leite de cabra quando cru.

A composição química do leite e CCS foram diferentes ($p < 0,05$) entre as regiões avaliadas (Tabela 1). Todos os componentes exceto lactose apresentaram valores médios maiores na região do Cariri. A legislação vigente para leite caprino estabelece teor mínimo de proteína de 2,8% e para lactose 4,3% (MAPA, 2000). Os teores de lactose encontrados no leite da propriedade localizada na região Cariri não atenderam tais exigências, por outro lado, o teor de proteína do leite oriundo da propriedade na região Brejo foi inferior ao mínimo exigido na legislação.

Tabela 1. Valores médios dos componentes químicos do leite em percentual (%) e Contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano.

	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos totais (%)	CCS (Log.cs/mL)
Cariri	2,84 ^a	2,85 ^a	4,01 ^b	10,72 ^a	5,42 ^a
Brejo	2,06 ^b	2,67 ^b	4,62 ^a	9,39 ^b	4,91 ^b
EPM (±)	±0,18	±0,45	±0,03	±0,22	±0,05

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estaticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O sequenciamento das bibliotecas genômicas da região V3-V5 do gene 16S rRNA de amostras de leite gerou um total de 952.235 sequências R1 com número médio de 13 mil sequências por amostra. Após o filtro de qualidade padrão do QIIME, o número total de sequências válidas foi 952.082, representando 99,98% do total de sequências R1.

As bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria (36,9%), Firmicutes (26,9%) e Proteobacteria (22,6%) foram dominantes nas amostras de leite caprino avaliadas. Os filotaxões Bacteroidetes e Deinococcus-Thermus foram observados em proporções inferiores a 3%.

A Figura 1 apresenta a distribuição dos gêneros mais abundantes encontrados nas amostras de leite para as diferentes regiões avaliadas. Os gêneros *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* e *Methylobacterium* foram mais abundantes no leite produzido no Cariri, enquanto que os gêneros *Nocardioides*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Anoxybacillus*, *Acinetobacter* e *Escherichia-Shigella* foram mais abundantes no leite produzido no Brejo.

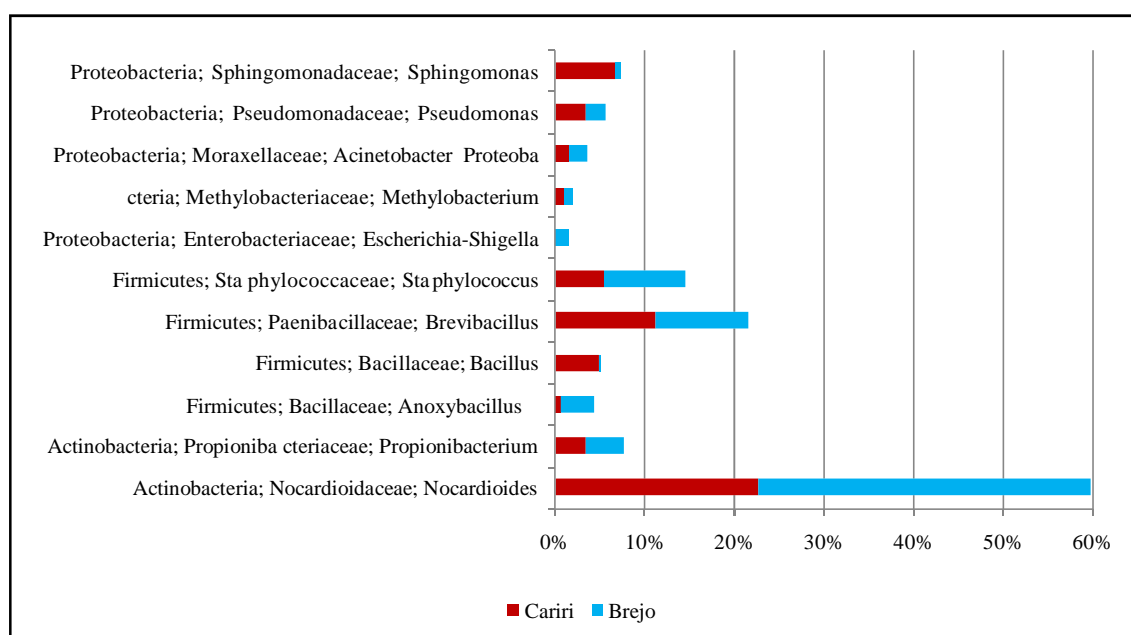


Figura 1. Composição bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.

A diversidade alfa foi maior nas amostras de leite do Brejo para o índice de Chao1 ($p < 0,05$), indicando haver maior riqueza na microbiota (Figura 2A). Em contrapartida, não houve diferença na diversidade alfa nas amostras de leite entre as regiões avaliadas quando aplicado o índice de Shannon (Figura 2B), no entanto, é possível observar a região Brejo apresentou maior diversidade microbiana nas amostras de leite.

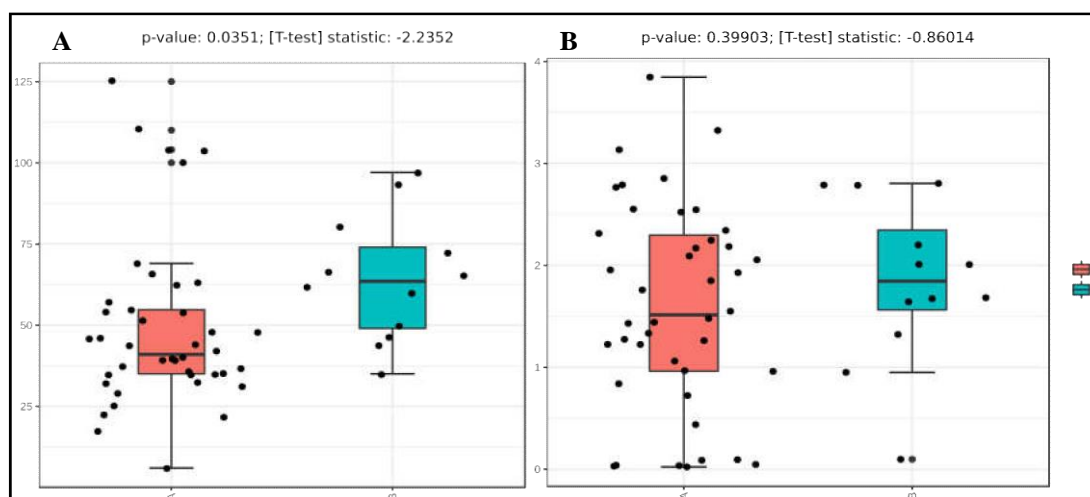


Figura 2. Diversidade alfa de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano. Boxplots baseados nos índices: A = Chao1 ($p=0,03$) e C = Shannon ($p=0,39$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $<0,05$. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo.

A Figura 3 apresenta a análise de diversidade beta através dos métodos PCoA baseados na métrica Unifrac não-ponderada. De acordo com a análise PCoA, os eixos apresentados (PC1 e PC2) explicam 49,3% da variância total da comunidade microbiana nos diferentes grupos avaliados. O conjunto da comunidade bacteriana das amostras de leite nas regiões do Cariri e Brejo foram diferentes ($p < 0,001$). Ainda que de maneira visual apresentaram-se parcialmente similares, observou-se maior dispersão das amostras de leite originadas da região Cariri.

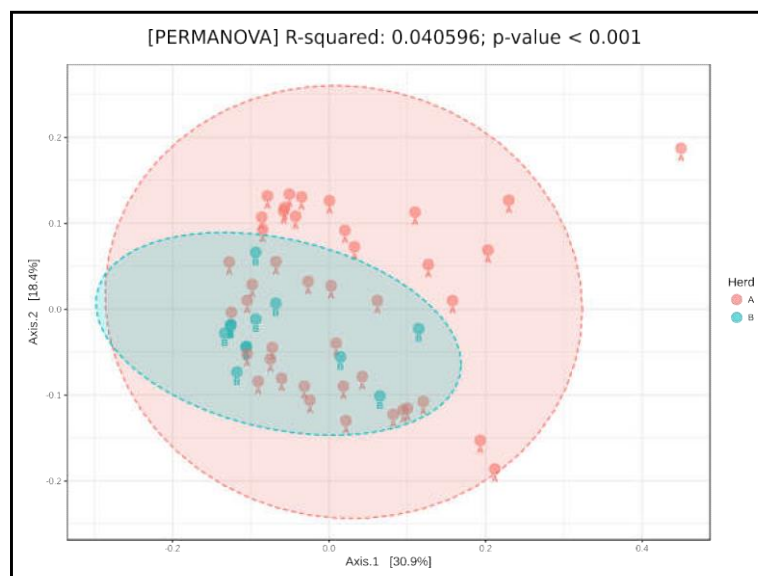


Figura 3. Diversidade beta de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano. PCoA baseados no índice Unifrac não ponderada ($p < 0,001$). Diferenças significativas entre os períodos de lactação quando o valor de p for $< 0,05$. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo.

A análise diferencial das proporções de *taxa* bacterianas dominantes revelou maior abundância dos gêneros *Sphingomonas* e *Bacillus* nas amostras de leite produzidas no Cariri, enquanto que os gêneros *Anoxybacillus* e *Escherichia/Shigella* foram mais abundantes nas amostras de leite originadas do Brejo (Figura 4).

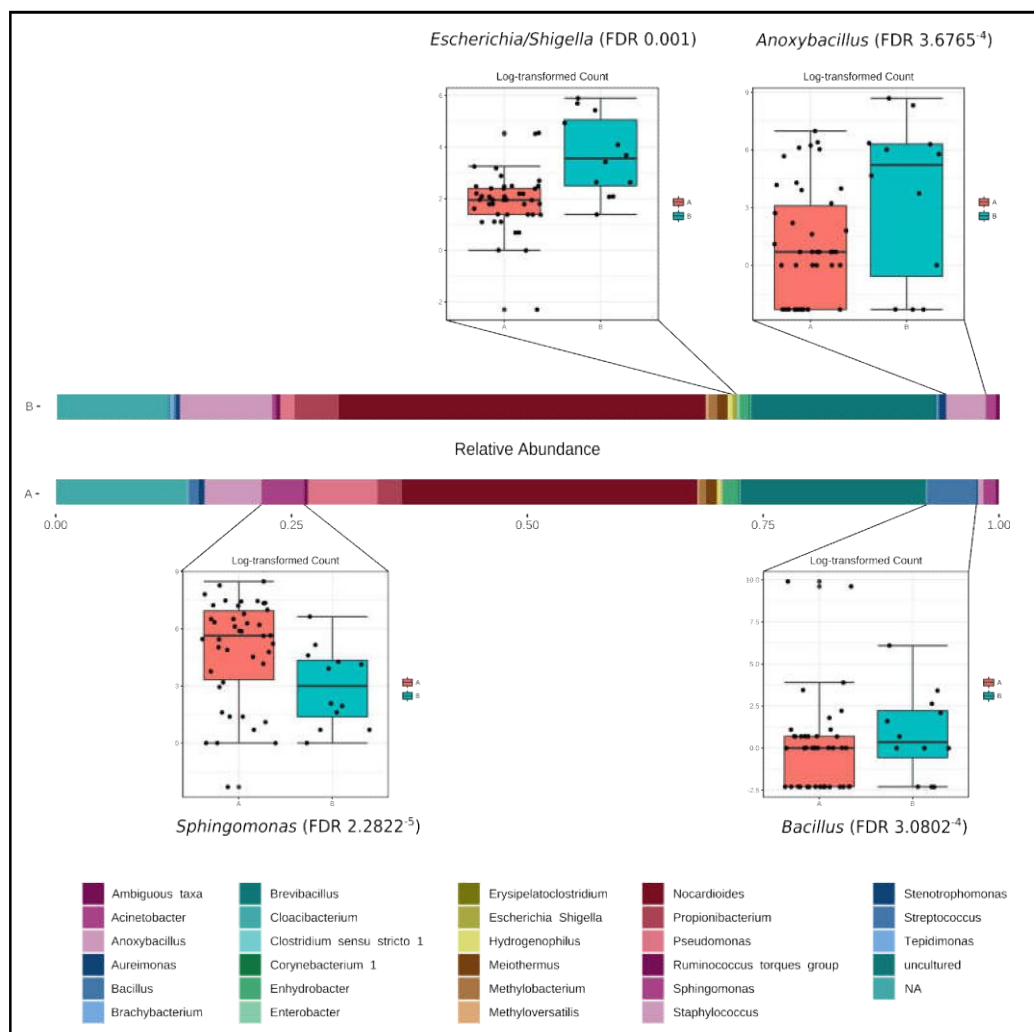


Figura 4. Análise da expressão diferencial da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA. Legenda: A = região Cariri e B = região Brejo.

4. DISCUSSÃO

A composição química do leite produzido diferiu ($p < 0,05$) entre as duas propriedades investigadas (Tabela 1), possivelmente, em decorrência de fatores particulares de cada região, que influenciam diretamente o sistema de produção e nutrição dos animais. A região do Cariri, por apresentar pluviosidade reduzida e solos rasos e pedregosos, condiciona a diversidade e riqueza da vegetação, predominando a vegetação de caatinga, o que pode limitar a produtividade dos caprinos leiteiros na região (Barbosa et al., 2009; Borburema et al., 2013). Por outro lado, o brejo paraibano por apresentar índices pluviométricos mais elevados em relação ao Cariri (por volta de 1.800 mm anuais), propicia o cultivo de várias espécies vegetais de ciclos curtos e perenes, bem como capineiras para a suplementação volumosa para a criação de animais (Costa et al., 2015).

A lactose do leite caprino foi maior na região Brejo e segundo estudos recentes, pode-se observar uma correlação negativa entre o teor de lactose e a CCS, destacando que quanto menor for o número de células somáticas na amostra de leite maior é o percentual de lactose (Moraes, 2017; Pinho, 2017); fato este que possivelmente pode ter ocorrido neste estudo, já que os valores de CCS são inversos aos teores de lactose. De maneira similar, estudos com leite bovino (Silva et al., 2014; Vargas et al., 2014; Baggio e Montanhini, 2017) também relataram que os teores de lactose diminuíram com o incremento da CCS.

Silva et al. (2014) sugerem que a redução no teor de lactose do leite associada à contagem elevada de CCS pode ser resultante de distúrbios da glândula mamária, ocorrendo menor biossíntese desse constituinte, ou do aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue, ocasionando perda de lactose para corrente sanguínea. Além disso, a infecção da glândula mamária pode contribuir de forma significativa na diminuição dos teores de lactose através da ação direta de patógenos mamários que utilizam esse carboidrato como principal substrato (Arashiro et al., 2006). Neste estudo, foram descartadas todas as amostras que apresentaram cultivo positivo (indicativo de infecção intramamária). Contudo, ainda foram observadas diferenças na CCS e nos parâmetros de qualidade do leite.

A composição da microbiota do leite cru é importante quanto aos aspectos de deterioração e segurança alimentar, e, portanto há implicações diretas para a indústria de lácteos e consumo. Estudos objetivando identificar fatores relacionados à composição da microbiota do leite tem sido realizados (McInnis et al., 2015; Patel et al., 2016; Urbaniak et al., 2016), em sua grande maioria, através de técnicas dependentes de cultivo. Neste estudo, a tecnologia de sequenciamento de DNA em larga escala permitiu a caracterização mais ampla da microbiota do leite caprino entre diferentes ambientes de produção de leite.

De forma geral, os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria apresentaram maior abundância nas amostras de leite avaliadas, independente da região em que foram coletadas. Tais resultados corroboram investigações recentes sobre a microbiota do leite de cabra utilizando metodologia similar (McInnis et al., 2015; Li et al., 2017; Zhang et al., 2017). Contudo, o presente estudo revela haver diferenças de alguns gêneros bacterianos em decorrência da origem da amostra. O leite caprino da região Brejo apresentou número de gêneros com proporções superiores em relação ao leite caprino da região Cariri, atestando o grau de riqueza e diversidade superior encontrado na região do Brejo quanto à diversidade alfa em ambos os índices aplicados (Chao1 e Shannon) (Figura 2).

Li et al. (2017) sugerem que as condições ambientais, incluindo temperatura e umidade, desempenham um papel importante na formação da composição bacteriana do leite,

visto que encontraram microbiotas diferentes entre ruminantes oriundos de regiões distintas. Os mesmos autores ressaltam que a alteração na comunidade bacteriana destes animais provavelmente seja reflexo da adaptação animal a diferentes estilos de vida, englobando clima, alimentação entre outros.

Outro aspecto importante seria relacionado ao aporte nutricional que o leite possui, dado que propicia um ambiente favorável para o crescimento de determinados microrganismos (Quigley et al., 2013). Contrariamente, é interessante notar que o leite oriundo da região Brejo, com teores menores dos componentes químicos, exceto lactose, apresentou maior riqueza e diversidade microbiana (Figura 2). Assim sendo, é provável que o teor de lactose esteja influenciando o desenvolvimento da microbiota do leite de cabras nesta região.

Os gêneros *Bacillus* e *Sphingomonas* foram mais abundantes no leite produzido na região Cariri (FDR <0.05 na análise de expressão diferencial) e isto, provavelmente, explique a riqueza e a diversidade inferiores da comunidade bacteriana comparativamente às amostras de leite caprino oriundas do Brejo. Li e colaboradores (2017) observaram que a presença *Bacillus* spp. está associada a menor riqueza bacteriana no leite caprino, principalmente, por interagir negativamente com os gêneros *Anoxybacillus*, *Halomonas*, *Propionibacterium*, *Ralstonia*, entre outros. *Bacillus* spp. são importantes organismos de degradação do leite, causando coagulação, e a produção de diferentes tipos de toxinas (Garcia et al., 2016).

Sphingomonas, gênero bacteriano frequentemente isolado de solos (Lee et al., 2017; Siddiqi et al., 2017), foi mais abundante nas amostras de leite da região do Cariri. Doyle et al. (2017) reportaram proporções mais elevadas deste gênero no leite de vacas a pasto comparativamente quando os animais eram alojados em sistema intensivos. Logo, a propriedade da região Cariri além de apresentar sistema de produção semi-extensivo desprovia de instalações fechadas para ordenha e suplementação alimentar, diferentemente da propriedade no Brejo que disponibilizava de alojamento animal.

Nesta perspectiva, o sistema de produção semi-extensivo associado a ausência de alojamento animal pode estar associado à maior dispersão das amostras de leite de cabra no Cariri observada no gráfico de análise de diversidade beta (Figura 3), supostamente, pelo maior acesso dos animais ao ambiente, bem como a variabilidade vegetal da caatinga ao contrário da propriedade no Brejo.

Por outro lado, os gêneros *Anoxybacillus* e *Escherichia/Shigella* foram mais abundantes (FDR <0.05) no leite produzido na região Brejo. Burgess et al. (2010) reportaram que algumas bactérias formadoras de esporos não causam danos aparentes aos alimentos ou

aos consumidores, mas a sua ocorrência em alimentos em grande quantidade reduz seu valor nutricional, como por exemplo, *Anoxybacillus flavithermus*; podendo estar correlacionado com o percentual dos componentes químicos do leite inferiores nesta região.

Escherichia é um dos gêneros tradicionalmente encontrados no trato gastrointestinal de ruminantes saudáveis, e considerado um dos agentes patogênicos comumente e mais preocupante encontrados nos alimentos para consumo humano (Grauke et al., 2002). Zhang et al. (2017), sugeriram que a abundância desse gênero nas amostras de leite sofre influência da raça das cabras. Por outro lado, Rodríguez (2014) relatou a hipótese que certas bactérias presentes no intestino podem atingir a glândula mamária através de uma via endógena. Posteriormente, Young et al. (2015) relataram a transferência de bactérias intestinais para a glândula mamária em vacas, apoiando a existência de uma via endógena entero-mamária, também, em ruminantes. Estudos dessa natureza podem, portanto, justificar a influência de fatores inerentes ao animal sobre a composição da microbiota do leite.

Os gêneros *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, encontrados neste estudo, são usualmente reportados como principais agentes etiológicos da mastite clínica e subclínica em ruminantes leiteiros (Silanikove et al., 2014; Acosta et al., 2016; Dore et al., 2016; Gelasakis et al., 2016). Outros estudos também relataram a ocorrência desses gêneros na microbiota do leite de cabras livres de infecção intramamária (McInnis et al., 2015; Li et al., 2017). Sugestivamente, os dados sugerem que quantidades específicas de bactérias encontradas no leite, e não apenas a composição da comunidade bacteriana, determinem o estado de desequilíbrio da microbiota do leite e, assim, em comunhão com as células do hospedeiro resulte em uma patologia e resposta imune na glândula mamária.

Brevibacillus foi reportado recentemente como um dos gêneros bacterianos relacionados ao metabolismo de aminoácidos no leite caprino (Zhang et al., 2017), assim como *Methylobacterium* e *Propionibacterium* foram relatados como parte da microbiota do leite humano e bovino oriundo de glândulas mamárias saudáveis (Jost et al., 2013; Ward et al., 2013; Jiménez et al., 2015; Oikonomou et al., 2014). Portanto, estes relatos sugerem que muitos gêneros bacterianos podem ser considerados benéficos e podem desempenhar papel importante na ecologia do leite desses animais.

Nocardioides foi o gênero bacteriano com maior abundância no leite caprino avaliado independente da região em que foi coletado e destaca-se por não ter sido ainda descrito na microbiota do leite. Há necessidade de elucidar o papel de *Nocardioides* no leite caprino. Geralmente encontrado em solo, Yu et al., (2007) relataram que cepas de *Nocardioides* possuem várias enzimas que transformam esteróis. Mais tarde, *Nocardioides* foi utilizado

como agente ativo no biocontrole de doenças do tomateiro (Carrer Filho, Romeiro e Garcia, 2008).

Os resultados do presente estudo demonstram que a microbiota do leite caprino é complexa e diversa e a ocorrência de diferenças na diversidade alfa, assim como a abundância diferencial de alguns *taxa* no leite coletados de regiões distintas podem estar associadas aos fatores geográficos peculiares de cada região, a fim de garantir “adaptações funcionais” específicas. Este estudo justifica a continuidade das investigações sobre o impacto dos fatores zootécnicos sobre a microbiota do leite de cabras, com potencial aplicação para melhoria do leite e derivados lácteos caprinos.

5. CONCLUSÕES

A composição e a estrutura da comunidade bacteriana do leite de cabras criadas em propriedades localizadas em diferentes microrregiões na Paraíba foram diferentes, principalmente quanto aos gêneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Anoxybacillus* e *Escherichia-Shigella* e presume-se que interações bacterianas no leite de cada região coexistam para garantir a manutenção da ecologia do leite e saúde das cabras investigadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; *et al.* Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- ADDIS, M. F.; TANCA, A.; UZZAU, S.; *et al.* The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular bioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 2016.
- APHA (American Public Health Association). Committee on Microbiological Methods for Foods: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, DC., 1992.
- AUST, V.; KNAPPSTEIN, K.; KUNZ, H.-J.; *et al.* Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1091–1103, 2013.
- BAGGIO, A. P.; MONTANHINI, M. T. M. Qualidade de leite cru produzido na região do Norte Pioneiro do Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 2, p. 184–189, 2017.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; *et al.* VEGETATION AND FLORA IN THE CARIRI REGION OF PARAÍBA. **Oecologia Australis**, v. 11, n. 3, p. 313–322, 2009.
- BHATT, V. D.; AHIR, V. B.; KORINGA, P. G.; *et al.* Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 639–650, 2012.

- BOIX-AMORÓS, A.; COLLADO, M. C.; MIRA, A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 492, 2016.
- BORBUREMA, J. B.; SOUZA, B. B.; CEZAR, M. F.; *et al.* INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS SOBRE A PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 9, n. 4, p. 15–19, 2013.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1957.
- BURGESS, S. A.; LINDSAY, D.; FLINT, S. H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 2, p. 215–225, 2010.
- CABRERA-RUBIO, R.; COLLADO, M. C.; LAITINEN, K.; *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544–551, 2012.
- CARRER FILHO, R.; S. ROMEIRO, R.; AUGUSTO O. GARCIA, F. Biocontrol of foliar disease of tomato plants by *Nocardioideus thermophilus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 457–460, 2008.
- CHAO, A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.
- COSTA, A. S.; OLIVEIRA, V. G.; PEREIRA, A. R.; *et al.* Estudo do clima na região do Brejo Paraibano utilizando técnicas de séries temporais, para previsão com o modelo Sarima. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 1, 2015.
- DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 2003.
- DORE, S.; LICARDI, M.; AMATISTE, S.; *et al.* Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. **Small Ruminant Research**, v. 141, p. 91–93, 2016.
- DOYLE, C. J.; GLEESON, D.; O'TOOLE, P. W.; *et al.* Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 2, p. e02694-16, 2017.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.
- FALENTIN, H.; RAULT, L.; NICOLAS, A.; *et al.* Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- GARCIA, L. N. H.; SILVA, F. F.; MAREZE, J.; *et al.* BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE CRU DE CABRA COM ATIVIDADE ANTAGONISTA A *BACILLUS CEREUS* E *PSEUDOMONAS* SPP. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 0, p. 74–76, 2016.
- GELASAKIS, A. I.; ANGELIDIS, A. S.; GIANNAKOU, R.; *et al.* Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3698–3708, 2016.

GRAUKE, L. J.; KUDVA, I. T.; YOON, J. W.; *et al.* Gastrointestinal Tract Location of *Escherichia coli* O157:H7 in Ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2269–2277, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=PPM01&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

JIMÉNEZ, E.; DE ANDRÉS, J.; MANRIQUE, M.; *et al.* Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. **Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association**, v. 31, n. 3, p. 406–415, 2015.

JOST, T.; LACROIX, C.; BRAEGGER, C.; *et al.* Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. **The British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 7, p. 1253–1262, 2013.

KABLE, M. E.; SRISENGFA, Y.; LAIRD, M.; *et al.* The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e00836-16, 2016.

KHODAYAR-PARDO, P.; MIRA-PASCUAL, L.; COLLADO, M. C.; *et al.* Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. **Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association**, v. 34, n. 8, p. 599–605, 2014.

LEE, K. C.; KIM, K. K.; EOM, M. K.; *et al.* *Sphingomonas gotjawalisoli* sp. nov., isolated from soil of a lava forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 2975–2979, 2017.

LI, Z.; WRIGHT, A. G.; YANG, Y.; *et al.* Unique Bacteria Community Composition and Co-occurrence in the Milk of Different Ruminants. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40950, 2017.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R.. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MCINNIS, E. A.; KALANETRA, K. M.; MILLS, D. A.; *et al.* Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. **Food Microbiology**, v. 46, p. 121–131, 2015.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S.. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MORAES, A. C. A. Estudo microbiológico e composição físico-química do leite de cabra. 2017. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/6951>>.

NMC - National Mastitis Council. Microbiological procedures for diagnosis of bovine udder infections and determination of milk quality (4^a Ed.). Verona: NMC, p. 47, 2004.

OIKONOMOU, G.; BICALHO, M. L.; MEIRA, E.; *et al.* Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.

PATEL, S. H.; VAIDYA, Y. H.; JOSHI, C. G.; *et al.* Culture-dependent assessment of bacterial diversity from human milk with lactational mastitis. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 437–443, 2016.

PEREIRA, R.V. V.; LIMA, S.; SILER, J. D.; *et al.* Ingestion of Milk Containing Very Low Concentration of Antimicrobials: Longitudinal Effect on Fecal Microbiota Composition in Preweaned Calves. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.

PINHO, S. M. A. Relação entre contagens de células somáticas do tanque e parâmetros de qualidade do leite de cabra serrana. 2017. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/14227>>.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal Infection Disease**, v.7, p.632-640, 1910. (*Milk - M-1-05-3: 2400g DIRECT MICROSCOPIC SOMATIC CELL COUNT. National Conference on Interstate Milk Shipments.* Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm075202.html>>.

PYLRO, V. S.; MORAIS, D. K.; DE OLIVEIRA, F. S.; *et al.* BMPOS: a Flexible and User-Friendly Tool Sets for Microbiome Studies. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 2, p. 443-447, 2016.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; ORTEGA, J. M.; *et al.* Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2013.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; *et al.* Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 2-3, p. 81-94, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; *et al.* The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

RODRÍGUEZ, J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 6, p. 779-784, 2014.

ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.

SHANNON, C. E., WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, p.29, 1949.

SIDDIQI, M. Z.; CHOI, G.; KIM, S.; *et al.* Sphingomonas agri sp. nov., a bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4429-4434, 2017.

SILANIKOVE, N.; MERIN, U.; LEITNER, G. On effects of subclinical mastitis and stage of lactation on milk quality in goats. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1-3, p. 76-82, 2014.

SILVA, V. N.; RANGEL, A. H. N.; NOVAES, L. P.; *et al.* Correlação entre a contagem de células somáticas e composição química no leite cru resfriado em propriedades do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 165-172, 2014.

SOUZA, L. L. *et al.* A Importância das Ômicas como Ferramentas para o Estudo da Prospecção de Microrganismos: Perspectivas e Desafios. **Uningá**, v. 18, n. 2, p. 16-21, 2014.

URBANIAK, C.; ANGELINI, M.; GLOOR, G. B.; *et al.* Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. **Microbiome**, v. 4, p. 1, 2016.

- VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; *et al.* Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 473–483, 2014.
- WARD, T. L.; HOSID, S.; IOSHIKHES, I.; *et al.* Human milk metagenome: a functional capacity analysis. **BMC microbiology**, v. 13, p. 116, 2013.
- WICKHAM, H. ggplot2. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180–185, 2011.
- YOUNG, W.; HINE, B. C.; WALLACE, O. A. M.; *et al.* Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, p. e888, 2015.
- YU, C.; ROH, H.; CHU, K. 17beta-estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. **Environmental science & technology**, v. 41, p. 486–92, 2007.
- ZHANG, F.; WANG, Z.; LEI, F.; *et al.* Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 2017.
- ZHANG, R.; HUO, W.; ZHU, W.; *et al.* Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 1072–1079, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento e a compreensão detalhada dos microrganismos presentes no leite caprino e sua interação com índices zootécnicos e práticas de manejo, bem como outros fatores, tem grande potencial de gerar aplicações voltadas ao aperfeiçoamento da capricocultura leiteira, assim como a qualidade e segurança alimentar do leite e seus derivados, visto que esta microbiota está intimamente relacionada ao leite comercial e à sanidade da glândula mamária.

Sem dúvidas, os microrganismos são excelentes modelos para aplicação das Ômicas, não somente pela facilidade em cultivá-los, mas por suas redes complexas, na qual sintetizam compostos importantes para diversos setores industriais e na compreensão sistêmica celular. Com as novas tecnologias de sequenciamento, a enorme diversidade e abundância dos microrganismos se mostram mais evidentes na prospecção.

A integração de diferentes Ciências Ômicas, como metagenômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica, são chave para a identificação de alvos para o melhoramento de estirpes, compreensão de patologias, desenvolvimento de drogas, reconhecimentos compostos de alto valor industrial, entre outros. Os desafios são grandes, porém ao utilizá-las, isoladas ou integradas, as Ômicas aplicadas a microrganismos, fornecem dados promissores para os futuros estudos que visem à prospecção, desenvolvimento e inter-relação com outros seres vivos e/ou produção animal.

Nossos resultados demonstram que a microbiota do leite caprino é complexa e que fatores fisiológicos, como a lactação e também fatores geográficos, como alimentação e clima; influenciam na composição e estrutura desta comunidade bacteriana. Foi possível identificar diferenças na abundância de alguns microrganismos, todavia, a continuidade de estudos é necessária para a elucidação da funcionalidade da rede microbiana encontrada no leite.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Perfil taxonômico da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes períodos de lactação ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 0,1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.

Filo;Família;Gênero	Período de Lactação		
	Inicial (%)	Intermediário (%)	Final (%)
Actinobacteria;Nocardioideaceae;Nocardioide	27,69	15,14	24,20
Actinobacteria;Propionibacteriaceae;Propionibacterium	4,13	1,61	2,44
Actinobacteria;Corynebacteriaceae;Corynebacterium 1	0,13	0,37	0,61
Bacteroidetes;Blattabacteriaceae;Candidatus Brownia	0,42	0,00	0,00
Bacteroidetes;Flavobacteriaceae;Empedobacter	0,41	0,38	0,03
Bacteroidetes;Flavobacteriaceae;Myroides	0,40	0,24	0,17
Bacteroidetes;Flavobacteriaceae;Salinimicrobium	0,00	0,49	0,00
Deinococcus-Thermus;Thermaceae;Meiothermus	0,41	0,89	0,61
Firmicutes;Bacillaceae;Anoxybacillus	0,39	0,34	0,30
Firmicutes;Bacillaceae;Bacillus	0,40	0,84	0,04
Firmicutes;Paenibacillaceae;Brevibacillus	12,46	16,42	1,12
Firmicutes;Paenibacillaceae;Paenibacillus	0,21	0,56	0,00
Firmicutes;Staphylococcaceae;Staphylococcus	4,46	2,14	12,00
Firmicutes;Streptococcaceae;Lactococcus	0,18	0,47	0,01
Firmicutes;Streptococcaceae;Streptococcus	0,12	0,09	0,04
Firmicutes;Family XI;Peptoniphilus	0,41	0,00	0,04
Firmicutes;Lachnospiraceae;Lachnospiraceae NK4A136 group	0,52	0,00	0,00
Firmicutes;Lachnospiraceae;[Ruminococcus] torques group	0,41	0,30	0,22
Proteobacteria;Aurantimonadaceae;Aureimonas	0,44	0,04	0,00
Proteobacteria;Methylobacteriaceae;Methylobacterium	0,95	0,81	0,88
Proteobacteria;Methylocystaceae;Pleomorphomonas	0,48	0,00	0,00
Proteobacteria;Sphingomonadaceae;Sphingobium	0,48	0,01	0,04
Proteobacteria;Sphingomonadaceae;Sphingomonas	5,55	4,60	11,46
Bacteroidetes;Sphingobacteriaceae;Sphingobacterium	0,04	0,00	0,91
Proteobacteria;Hydrogenophilaceae;Hydrogenophilus	0,97	0,37	0,70
Proteobacteria;Rhodocyclaceae;Methyloversatilis	0,46	0,15	0,00
Proteobacteria;Pasteurellaceae;Mannheimia	0,43	0,00	0,00
Proteobacteria;Moraxellaceae;Acinetobacter	0,69	3,30	0,52
Proteobacteria;Moraxellaceae;Enhydrobacter	0,24	1,54	0,48
Proteobacteria;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	1,58	8,08	0,39
Proteobacteria;Xanthomonadaceae;Thermomonas	0,44	0,00	0,00
Proteobacteria;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas	0,31	0,56	0,53
Proteobacteria;Caulobacteraceae;Brevundimonas	0,01	0,26	0,52

APÊNDICE B - Perfil taxonômico da comunidade bacteriana de amostras de leite de cabra em diferentes regiões do semiárido paraibano ao nível de gênero (gêneros com abundância acima de 0,1%) a partir do sequenciamento da região V3-V5 do gene 16S rRNA.

Filo;Família;Gênero	Microrregiões da Paraíba	
	Cariri (%)	Brejo (%)
Actinobacteria;Nocardioideaceae;Nocardioide	22,67	37,81
Actinobacteria;Propionibacteriaceae;Propionibacterium	3,32	4,34
Bacteroidetes;Flavobacteriaceae;Myroides	0,67	0,06
Bacteroidetes;Sphingobacteriaceae;Sphingobacterium	0,71	0,12
Bacteroidetes;Flavobacteriaceae;Cloacibacterium	0,09	0,40
Deinococcus-Thermus;Thermaceae;Meiothermus	0,56	0,67
Firmicutes;Bacillaceae;Anoxybacillus	0,63	3,62
Firmicutes;Bacillaceae;Bacillus	4,80	0,17
Firmicutes;Paenibacillaceae;Brevibacillus	11,08	10,43
Firmicutes;Staphylococcaceae;Staphylococcus	5,48	9,02
Firmicutes;Family XI;Peptoniphilus	0,18	0,54
Firmicutes;Lachnospiraceae;[Ruminococcus] torques group	0,33	0,45
Firmicutes;Streptococcaceae;Streptococcus	0,85	0,90
Proteobacteria;Methylobacteriaceae;Methylobacterium	1,00	0,85
Proteobacteria;Sphingomonadaceae;Sphingobium	0,22	0,43
Proteobacteria;Sphingomonadaceae;Sphingomonas	6,64	0,61
Proteobacteria;Hydrogenophilaceae;Hydrogenophilus	0,71	0,44
Proteobacteria;Moraxellaceae;Acinetobacter	1,52	2,00
Proteobacteria;Moraxellaceae;Enhydrobacter	0,73	0,77
Proteobacteria;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	3,46	2,08
Proteobacteria;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas	0,78	0,45
Proteobacteria;Aurantimonadaceae;Aureimonas	0,20	0,62
Proteobacteria;Rhizobiaceae;Rhizobium	0,06	0,57
Proteobacteria;Burkholderiaceae;Ralstonia	0,16	0,69
Proteobacteria;Enterobacteriaceae;Enterobacter	0,22	0,47
Proteobacteria;Enterobacteriaceae;Escherichia-Shigella	0,05	1,44